EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON EICOSAPENTAENSÄURE VERSUS ARACHIDONSÄURE AUF DIE IMMUNANTWORT POLYMORPHKERNIGER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN IN EINEM KOINKUBATIONSMODELL VON GRANULOZYTEN UND ENDOTHELZELLEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Olaf Herm

aus Wiedenest

Gießen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik II

Direktor: Prof. Dr. Seeger

Klinische Forschergruppe Respiratorische Insuffizienz

Leiter: Prof. Dr. Dr. Grimminger

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Reiter

Tag der Disputation: 04.11.2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 8

1.1. Vorwort 8

1.2. PMN in der Lungenstrombahn 8

1.3. Steuerung der zellulären Reizantwort und Signaltransduktion 9

1.4. Metabolismus und physiologische Bedeutung der Lipid-mediatoren 10

1.5. Interaktion von PMN und EC unter inflammatorischen Bedingungen: Kooperative Eicosanoidsynthese 13

1.6. Eicosapentaensäure als alternatives Substrat der Lipoxygenase15

1.7. Fragestellung 18

2. Materialien und Methoden 19

2.1. Materialien 19

2.1.1. Rezepturen der Puffer und Nährmedien 19

2.1.2. Reagenzien und Pharmaka 21

2.1.3. Authentische Standards 23

2.1.4. Sonstige Materialien 23

2.1.5. Geräte 24

2.2. Methoden 25

2.2.1. Isolation humaner Granulozyten 25

2.2.2. Vorbereitung und Inkubation der Endothelzellen 26

2.2.3. Versuchsprotokoll 26

2.2.4. Inhibition der Cyclooxygenase und der Phospholipase A_2 27

2.2.5. Messung der Elastaseaktivität 27

2.2.6. Analytik der Lipoxygenaseprodukte 28

2.2.7. Messung der Adhärenz 30

2.2.8. Analytik der Inositolphosphate 31

2.2.9. Statistik 32

3. Ergebnisse 33

3.1. Einfluß der Vorinkubation von Endothelzellen mit Eicosapentaensäure versus Arachidonsäure auf die Immunantwort koinkubierter PMN 33

3.1.1. Degranulationsreaktion 33

3.1.2. Produktion von Lipoxygenasemetaboliten 34

3.1.3. Adhärenz von PMN an EC 35

3.1.4. Inositolphosphatbildung 35

3.2. Auswirkung der selektiven Inhibition zweier Enzyme auf Degranulationsreaktion und Produktion von Lipoxygenase-metaboliten durch PMN am Inkubationsmodell 36

3.2.1. Cyclooxygenaseinhibition 36

3.2.2. Inhibition der Phospholipase A_2 36

4. Diskussion 56

4.1. Modulation der Immunantwort von PMN durch Eicosa-pentaensäure 56

4.1.1. Verminderung der Degranulationsreaktion 56

4.1.2. Verändertes Profil der Lipoxygenasemetabolite 57

4.1.3. Herabgesetzte Adhärenz von PMN an Endothelzellen 58

4.1.4. Veränderung der Signaltransduktion 60

4.2. Bedeutung der Cyclooxygenase und Phospholipase A_2 für die immunmodulierende Wirkung von EPA am Inkubationsmodell61

4.2.1. Bedeutung der Cyclooxygenase 61

4.2.2. Bedeutung der Phospholipase A_2 62

5. Zusammenfassung 64

6. Literaturverzeichnis 66

7. Lebenslauf...72

8. Danksagung...73

Abkürzungen

• AA	Arachidonsäure (arachidonic acid)
• EC	Endothelzelle (endothelial cell)
• EPA	Eicosapentaensäure (eicosapentaenoic acid)
• HEPE	Hydroxyeicosapentaensäure
• HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
• HPET(P)E	Hydroperoxyeicosatetra(penta)ensäure
• HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (high-performance liquid chromatography)
• HUVEC	Aus menschlichen Nabelschnüren gewonnene Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells)
• IL	Interleukin, z.B. IL-1, Interleukin 1
• IP	Inositolphosphat
• LT	Leukotrien, z.B. LTB_4, Leukotrien B_4
• PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
• PG	Prostaglandin, z.B. PGE_2, Prostaglandin E_2
• PMN	Polymorphkerniger Neutrophiler Granulozyt
• TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α

1. Einleitung

1.1. Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 1995 bis April 1996 in der Klinischen Forschergruppe "Respiratorische Insuffizienz" unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Seeger und Herrn Prof. Dr. Dr. Grimminger. Die Untersuchungen befaßten sich mit dem Einfluß zweier verschiedener freier Fettsäuren auf die Immunantwort polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) an einem Koinkubationsmodell von PMN und Endothelzellen. Hintergrund ist die Notwendigkeit der parenteralen Ernährung von Patienten mit schweren inflammatorischen Lungenerkrankungen (v.a. ARDS und Sepsis) mit Lipiden und deren Einfluß auf die inflammatorische Kapazität der PMN in der Lungenstrombahn.

1.2. PMN in der Lungenstrombahn

In der kapillären Strombahn der Lunge befindet sich ein großer Pool von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), der in ständigem Austausch mit der systemischen Zirkulation steht. Dieser Pool kann sich auf zahlreiche Reize hin innerhalb kürzester Zeit noch um ein Vielfaches vergrößern (1). PMN und Gefäßendothelzellen (EC) treten dabei in engen Kontakt miteinander, da der Fluß durch die Kapillaren der Endstrombahn für die PMN mit einer Verformung des Zellskeletts verbunden ist - ihr durchschnittlicher Durchmesser ist größer als der der Kapillaren. So kommt es zu einer Verlangsamung der Flußgeschwindigkeit der PMN, dem sogenannten "Sticking".

Werden PMN oder EC stimuliert - dies geschieht z.B. durch bakterielle Toxine oder durch die Freisetzung von Chemotaxinen aus Monozyten oder Granulozyten - so kommt es zur Exprimation korrespondierender Adhäsionsmoleküle auf den Zelloberflächen von PMN und EC.

Diese gehören zu der Gruppe der Selectine (P-, E-, L-Selectin), durch die zunächst eine lockere Bindung zustandekommt - die PMN "rollen" auf den EC, bis sie einem inflammatorischen Focus näherkommen. Dort kommt es zur festen Adhäsion mittels β_2-Integrinen (CD 11, CD 18) und den endothelialen Gegenrezeptoren VCAM-1 und ICAM-1. Die adhärenten PMN können anschließend die Lungenstrombahn verlassen (Transmigration); sie werden von Chemotaxinen ins Interstitium geleitet, wo sie ihr antimikrobielles Potential durch Degranulation von Proteasen, Hydrolasen und reaktiven toxischen Sauerstoffspezies freisetzen (2,3).

1.3. Steuerung der zellulären Reizantwort und Signaltransduktion

Diese komplexe Interaktion wird koordiniert durch lokale und systemische Mediatoren. Lokalmediatoren entfalten ihre Wirkung nur auf eng begrenztem Raum, ohne daß dabei systemische Wirkungen auftreten müssen. Zu ihnen zählen im Wesentlichen Leukotriene, Komplementfaktoren und der Plättchenaktivierende Faktor (PAF). Diese Botenstoffe binden an entsprechende Rezeptoren der Zellmembran der Zielzellen. Im Zellinneren werden die Signale durch Second Messenger weitergeleitet: Die Bindung der Mediatoren an die Rezeptoren bewirkt unter anderem eine Aktivierung der membrangebundenen Phospholipase C. Diese katalysiert die Bildung von Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) aus in der Zellmembran vorhandenem Phosphatidylbisphosphat. IP_3 wiederum stimuliert die intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum, was die Effektorsysteme der Zielzelle aktiviert. DAG aktiviert die Proteinkinase C (2). Zu den Zielzellen gehören u.a. Granulozyten, die auf diesem Wege zu vermehrter Produktion von Leukotrienen, Proteasen und Sauerstoffradikalen angeregt werden, sodaß innerhalb kurzer Zeit eine außerordentlich potente, lokal begrenzte Abwehrreaktion entsteht.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich v.a. mit Lipidmediatoren aus der Gruppe der Leuko-

triene. Lipidmediatoren werden aus Arachidonsäure, einer mehrfach ungesättigten Fettsäure, synthetisiert.

1.4. *Metabolismus und physiologische Bedeutung der Lipidmediatoren*

Arachidonsäure ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure aus 20 Kohlenstoffatomen, deren letzte Doppelbindung 6 C-Atome vom Methylende entfernt ist (C20:4:6, ω-6-Fettsäure). Sie wird im Organismus in den Phospholipidpools der Zellmembranen gespeichert. Die Freisetzung der Fettsäure unterliegt dabei der Kontrolle durch Phospholipasen (4). Alternativ kann Arachidonsäure dem Organismus parenteral zur Verfügung gestellt werden: Aus Lipidinfusionen, die vor allem Triglyzeride enthalten, können unter dem Einfluß der Lipoproteinlipase freie Fettsäuren abgespaltet werden (5). Intrazellulär wird die Arachidonsäure im Wesentlichen auf zwei Wegen metabolisiert: durch Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen. Produkte der Cyclooxygenasen sind die verschiedenen Prostaglandine und Thromboxane. Im folgenden soll v.a. auf den Lipoxygenaseweg eingegangen werden, dessen Hauptprodukte die Leukotriene sind.

Erster Schritt im Metabolismus der Arachidonsäure ist der Einbau eines Sauerstoffmoleküls an Position 5, 12 oder 15 der Kohlenstoffkette durch die 5-, 12- bzw. 15-Lipoxygenase. Produkte dieser Reaktion sind 5-, 12- und 15-S-Hydroxyperoxyeicosatetraensäure (HPETE). Diese werden in einem Reduktionsschritt zu 5-, 12- und 15-Hydroxyeicosatetraensäure (HETEs) metabolisiert. HETEs können in die Phospholipidpools der Zelle integriert werden, wo sie die Eigenschaften der Membran modulieren (6). Sie besitzen aber auch direkte physiologische Wirkungen, indem sie die Aktivität von Lipoxygenasen und Phospholipasen beeinflussen: 5-HPETE und 5-HETE können zur erhöhten Freisetzung von Arachidonsäure aus

Zellmembranen durch Phospholipasen beitragen (7), 15-HETE hemmt die 5-Lipoxygenase in Granulozyten (8).

Alternativ kann aus 5-HPETE LTA_4 synthetisiert werden, ein Molekül mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden, das auf drei verschiedenenWegen weiter metabolisiert wird:

a) Nichtenzymatische, spontane Hydrolyse zu 5,6-diHETEs und 6-trans-LTB_4 sowie 6-trans-12-epi-LTB_4,

b) Hydrolyse durch die LTA-Hydrolase, die als Produkt LTB_4 liefert, und

c) Ringöffnung und Einbau von Glutathion durch eine Glutathion-Transferase; Produkt ist dabei LTC_4.

LTB_4 ist eines der stärksten bekannten Chemotaxine für PMN. Es bindet über spezifische Rezeptoren an PMN und führt zu verstärkter Degranulation lysosomaler Enzyme und kann außerdem als Ca^{2+}-Ionophor wirken (9). Des weiteren verstärkt es die Adhärenz von PMN an EC, indem es die Exprimation von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von PMN steigert (2). LTB_4 wird von Cytochrom P-450 zu 20-Hydroxy-LTB_4 und weiter zu 20-Carboxy-LTB_4 abgebaut.

LTC_4 wird von einer Transpeptidase zu LTD_4, dieses wiederum von einer Dipeptidase zu LTE_4 metabolisiert. LTC_4, D_4 und E_4 bilden die Gruppe der Cysteinylleukotriene, die z.B. an den Atemwegen stark vasokonstriktorisch, bronchokonstriktorisch und hypersekretorisch wirken (10).

In PMN überwiegt der Metabolismus von Arachidonsäure über die 5-Lipoxygenase (11). 5-Lipoxygenase kann durch einen intrazellulären Anstieg freien Calciums aktiviert werden, welches eine Translokation des Enzyms vom Cytosol an die Zellmembran bewirkt (12). Nach der Aktivierung der 5-Lipoxygenase kann die Menge der gebildeten Leukotriene durch ein

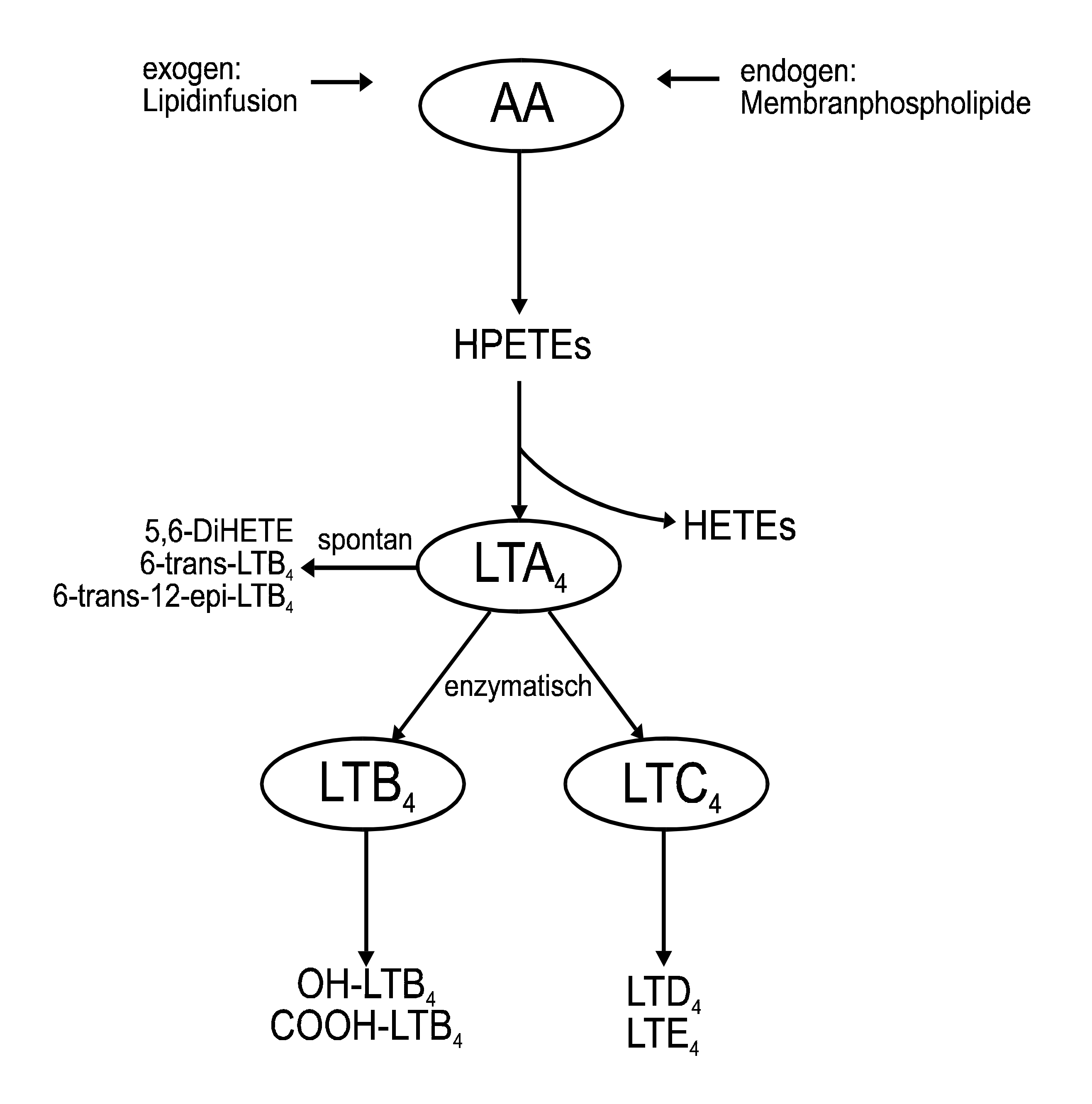


Abbildung 1: Metabolismus der Arachidonsäure durch 5-Lipoxygenase. Dargestellt sind die Entstehung des zentralen Produktes LTA_4 sowie dessen enzymatischer Abbau zu LTB_4 und den Cysteinylleukotrienen LTC_4, LTD_4 und LTE_4, außerdem der spontane Zerfall von LTA_4 zu den stereoisomeren Paaren 5,6-DiHETE und 6-trans (-12-epi)-LTB_4.

erhöhtes Angebot an Substrat (freie Fettsäure) um ein Vielfaches gesteigert werden (13).
Eine Übersicht des Arachidonsäuremetabolismus zeigt Abbildung 1.

1.5. Interaktion von PMN und EC unter inflammatorischen Bedingungen: Kooperative Eicosanoidsynthese

Unter inflammatorischen Bedingungen kann das Zusammenspiel zwischen PMN und EC nachhaltig gestört werden, vor allem durch die Produktion von Exotoxin oder die Freisetzung von Endotoxin aus Bakterien. Endotoxin wirkt dabei als "Primer" von PMN und EC, der sie durch erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen und eine Erhöhung des Destruktionspotentials der PMN empfänglicher macht für einen späteren zweiten Stimulus (14). Dieser Stimulus kann z.B. durch Exotoxin entstehen, das an den PMN als Porenbildner für Ca^{2+} wirkt, somit einen sofortigen Calcium-Influx bewirkt und die geregelte Signaltransduktion über Second Messenger kurzschließt (15). Dies führt zur Degranulation und Freisetzung der Proteasen des PMN noch in der Kapillarstrombahn mit der Folge schwerer lokaler Gewebsdestruktion (16). Die Stimulation des PMN bewirkt darüberhinaus eine erhöhte Produktion von Lipidmediatoren, die ihrerseits stimulierend auf den PMN einwirken, so daß es zu einer überschießenden Immunantwort kommt. In Untersuchungen an koinkubierten PMN und EC konnte außerdem gezeigt werden, daß Leukotriene, ebenso wie PAF, eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen (Integrine und ICAMs) bewirken, während 15-HETE diese Wirkung inhibiert (17).

Die Synthese der Leukotriene geschieht dabei kooperativ zwischen PMN und EC: PMN synthetisieren aus Arachidonsäure, die ihnen von Endothelzellen geliefert wird, LTA_4. LTA_4 wird zum einen von PMN zu LTB_4 weiterverarbeitet, zum anderen an die EC zurückgegeben und dort zu LTC_4, LTD_4 und LTE_4 metabolisiert (18,19,20). Beide Zelltypen ergänzen sich

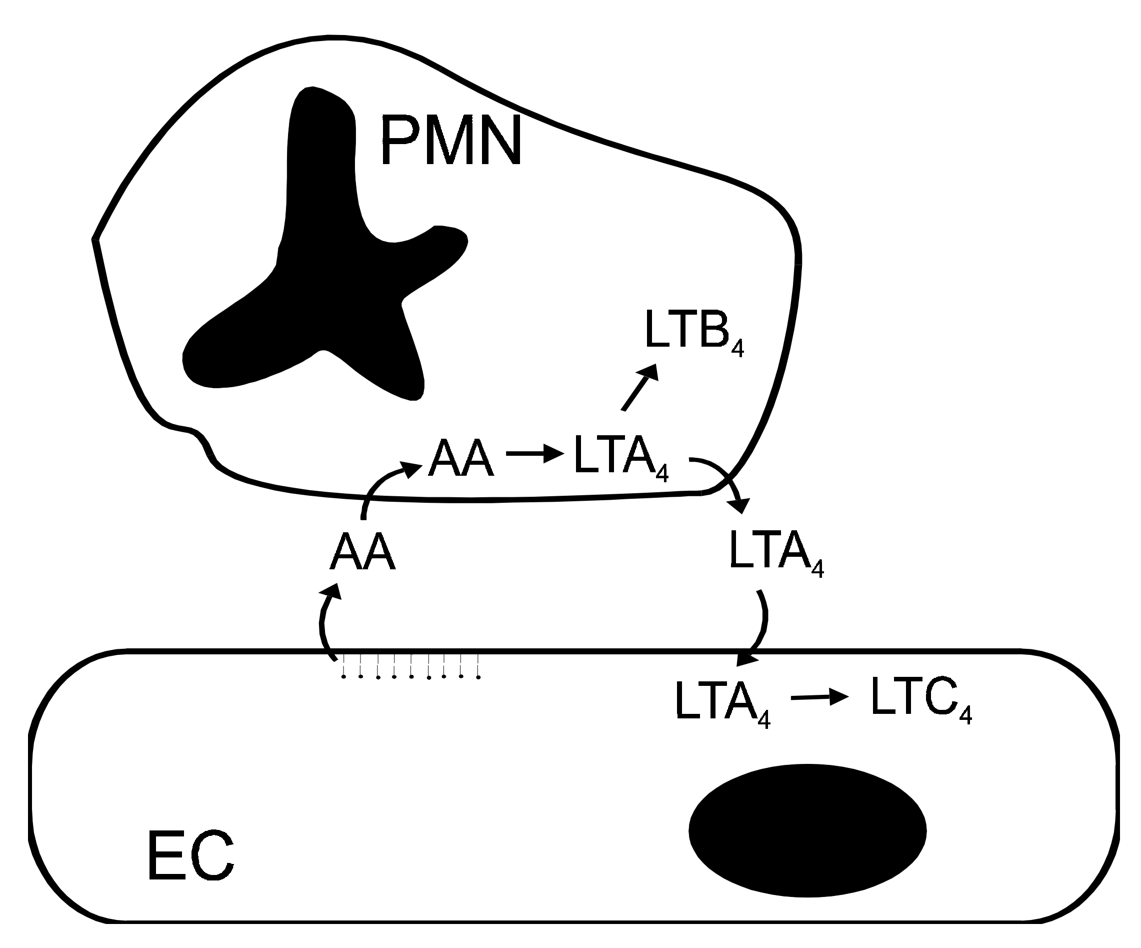


Abbildung 2: Das Konzept der kooperativen Eicosanoidsynthese. Aus Arachidonsäure (AA), das aus den Phospholipidpools der Endothelzelle (EC) freigesetzt wird, synthetisiert der PMN LTA_4. Dieses kann entweder im PMN zu LTB_4 metabolisiert, oder an die Endothelzelle zurückgegeben und dort zu den Cysteinylleukotrienen verarbeitet werden.

durch gegenseitige Bereitstellung der notwendigen Substrate und durch ihre komplementäre Enzymausstattung, ein Mechanismus, der vermutlich der Feinabstimmung der Immunantwort dient (Abb. 2). Durch die Kooperation von PMN und Endothelzellen wird die Leukotriensynthese gesteigert und das resultierende Leukotrienprofil moduliert im Sinne eines Anstiegs der Cysteinylleukotriene und eines Abfalls des produzierten 5-HETE (21).

1.6. Eicosapentaensäure als alternatives Substrat der Lipoxygenase

Vor dem Hintergrund der proinflammatorischen Wirkung der Metabolite der Arachidonsäure hat der Einsatz von alternativen Fettsäuren, insbesondere der in Fischölen enthaltenen Eicosapentaensäure (EPA), das wissenschaftliche Interesse erregt. Ausgehend von Untersuchungen an Bevölkerungsgruppen, die sich hauptsächlich von Tiefseefisch ernähren, konnte gezeigt werden, daß Fischöle antiinflammatorische Wirksamkeit besitzen (22, 23). Inzwischen wurden zahlreiche klinische Studien und experimentelle Untersuchungen durchgeführt, die sich mit der Wirkung der aus Fischölen gewonnenen freien Fettsäuren beschäftigen.

Eicosapentaensäure kann als natürlich vorkommendes Äquivalent zu Arachidonsäure angesehen werden: sie besitzt wie die Arachidonsäure eine Kohlenstoffkette aus 20 Atomen, verfügt jedoch über eine fünfte Doppelbindung, die 3 C-Atome vom Methylende entfernt ist (C20:5:3), und wird daher als ω-3-Fettsäure bezeichnet. Eicosapentaensäure wird wie Arachidonsäure von Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen metabolisiert, dabei entstehen entsprechende Metabolite (Abb. 3), die in ihrer inflammatorischen Potenz aber weit unter der der Metabolite der Arachidonsäure bleiben (24, 25). Da EPA im Vergleich zu Arachidonsäure das bevorzugte Substrat der Lipoxygenase ist (26), kann eine Anreicherung der Diät mit EPA positive Effekte auf zahlreiche inflammatorische Erkrankungen haben. Dies gilt insbesondere für die parenterale Zufuhr, denn auf diesem Weg lassen sich die Hürde der enteralen Aufnahme und der Einbau der

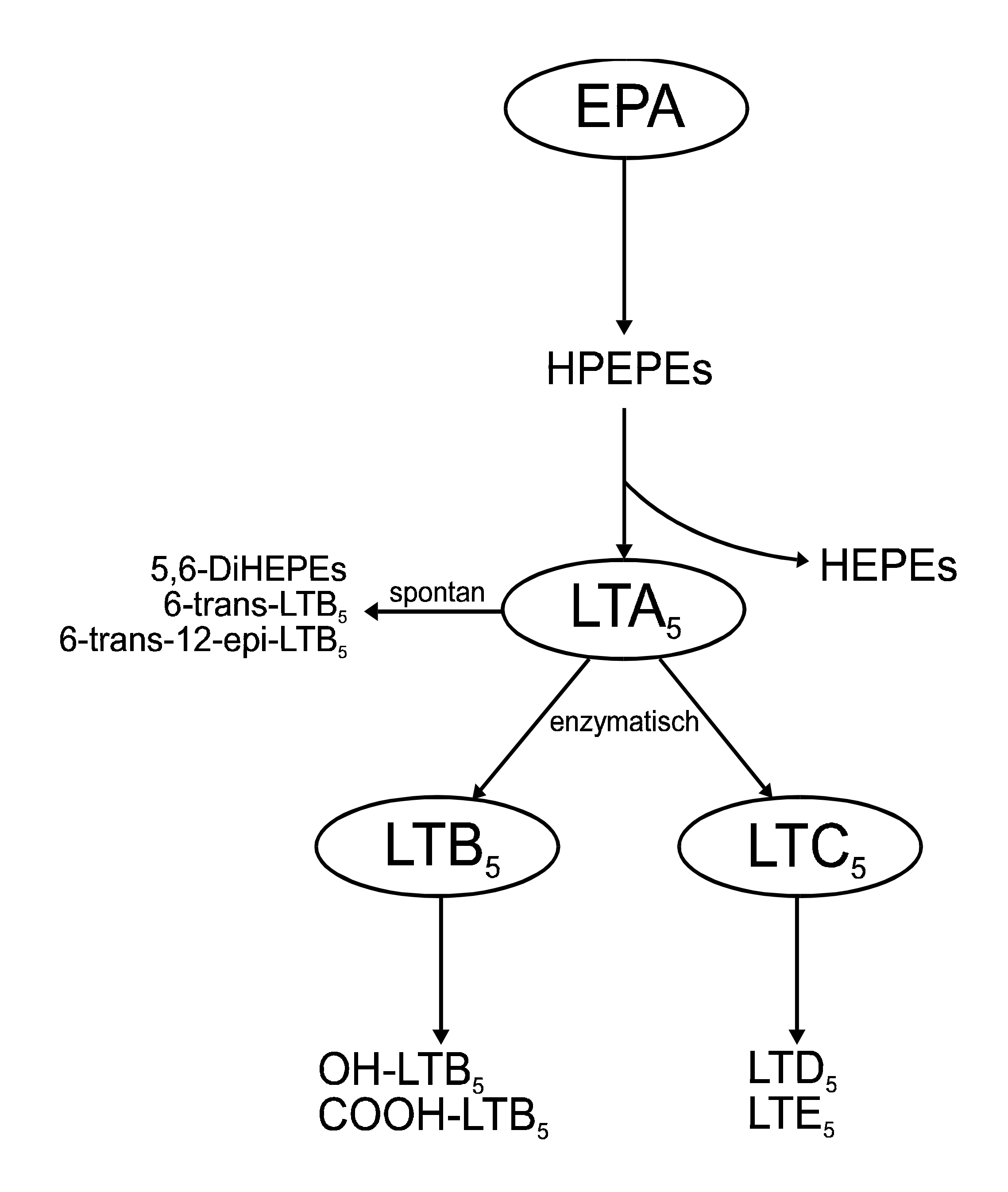


Abbildung 3: Metabolismus der Eicosapentaensäure durch 5-Lipoxygenase. In Analogie zum Metabolismus der Arachidonsäure entsteht zunächst LTA_5, welches enzymatisch zu LTB_5 und den Cysteinylleukotrienen LTC_5, LTD_5 und LTE_5 verarbeitet wird, bzw. spontan in die stereoisomeren Paare 5,6-DiHEPE und 6-trans(-12-epi)-LTB_5 zerfällt.

Fettsäure in Transportvesikel umgehen, so daß wesentlich höhere Konzentrationen an freier Fettsäure für die Synthese aktiver Metabolite zur Verfügung stehen.

Im einzelnen konnte in klinischen Studien gezeigt werden, daß die Zufuhr von ω-3-Fettsäuren den Verlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (27), Rheumatoider Arthritiden (28) und der Psoriasis (29) positiv beeinflußt. Ω-3-Fettsäuren haben einen positiven Effekt nach Nierentransplantation (30) und können den Verlauf der Sepsis verbessern (31).

Im Tierversuch konnten darüber hinaus nach Auslösung akuter inflammatorischer Vorgänge im Lungenkapillarbett ein Benefit in Bezug auf pulmonale Hypertension und eine verringerte Gefäßpermeabilität nachgewiesen werden (32, 33, 34). Ebenfalls am Tiermodell wurden eine verminderte Graft-versus-Host-Reaktion (35) und verringerte Zellschäden bei Herztransplantation festgestellt (36).

Diese Wirkungen beruhen vermutlich u.a. auf folgenden Vorgängen:

1) Ω-3-Fettsäuremetabolite unterdrücken die Freisetzung von TNF-α und IL-1, zwei Cytokinen mit zentraler Rolle in der Pathogenese inflammatorischer Prozesse (37).

2) Die Metabolite der ω-3-Fettsäuren, insbesondere LTB_5 und PGE_3 haben geringere inflammatorische bzw. sogar protektive Potenz, was die chemotaktische und stimulierende Wirkung auf PMN betrifft (38): Die Zytokin-induzierte Bildung und Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 an der Zelloberfläche von Endothelzellen wird herabgesetzt (39).

3) Ω-3-Fettsäuren und ihre Metabolite beeinflussen die Signaltransduktion in der Zelle sowohl auf Ebene der Second-Messenger-Bildung als auch auf der Ebene der Gentranskription (40, 41).

Die Infusion von Lipidemulsionen führt über eine Aktivierung der Lipoproteinlipase zur Freisetzung freier Fettsäuren (5). Diese können von den Zellen direkt metabolisiert werden. Die

Verwendung von ω-3-Lipidemulsionen stellt daher eine potente Quelle für die Zufuhr freier ω-3-Fettsäuren dar. Da bei vielen Patienten mit septischen Krankheitsbildern auch die Notwendigkeit zur parenteralen Ernährung u.a. mit Lipiden besteht, kann die alternative Gabe solcher ω-3-Lipidemulsionen zu einer Modulation der Immunantwort führen (Übersichten bei 42, 43).

1.7. Fragestellung

Im einzelnen wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

1) Wird Eicosapentaensäure bei Zufuhr als freie Fettsäure *in vitro* in den Phospholipidpools der EC gespeichert?

2) Kann Eicosapentaensäure die Immunantwort von PMN auch über den Umweg der Endothelzellen modulieren?

   Welche Auswirkungen zeigen sich insbesondere

   - auf das entstehende Leukotrienprofil?
   - auf die Degranulationsreaktion von PMN am Beispiel der Elastase?
   - auf die Adhärenz von PMN an EC?
   - auf die Bildung von Second-Messenger-Produkten?

3) Lassen sich eventuelle Effekte durch Inhibition von Enzymsystemen verändern?

   Welchen Einfluß hat am vorliegenden Modell

   - die Inhibition der Cyclooxygenase?
   - die Inhibition der Phospholipase A_2?

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Rezepturen der Puffer und Nährmedien

- Elastase-Messpuffer

  1,21 g Trispuffer (Trometamol)

  +5,62 g NaCl

  +60 ml Aqua Dest.

  pH ad 8,3

  ad 100 ml Aqua Dest.

- Elastase-Substrat

  25 mg Chromogenes Substrat S-2484 in 7 ml DMSO gelöst, 1:4 verdünnt mit Aqua Dest.

- Elastase-Verdünnungspuffer

  1,2 ml Eisessig

  +60 ml Aqua Dest.

  +1 n NaOH ad pH 5,5

  +0,1 g Tween 80

  ad 100 ml Aqua Dest.

- Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Hanks/HEPES - Puffer mit Calcium und Magnesium (1l):

  100 ml HBSS

  +900 ml Aqua Dest.

  +6 g HEPES (=25 mM)

+1 n NaOH ad pH 7,4

- HBS (HEPES-Buffered Saline)-Puffer (0,5l):

  500 ml Aqua Dest.

  +2,383 g HEPES

  +4 g NaCl

  +1 n NaOH ad pH 7,6

- HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N‘-2-ethanesulfonic acid); MW 238,3; pKa 7,5 bei 25°C, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

- PBS (Phosphate-Buffered Saline)-Puffer ohne Calcium und Magnesium(1l):

  8,0 g NaCl

  +0,2 g KCl

  +0,2 g KH_2PO_4

  +1,5 g Na_2HPO_4x2 H_2O

  ad 1000 ml Aqua Dest.

  1n NaOH ad pH 7,4

- PBS (Phosphate-Buffered Saline)-Puffer mit Calcium und Magnesium(1l):

  8,0 g NaCl

  +0,2 g Kcl

  +0,2 g KH_2PO_4

  +1,5 g Na_2HPO_4x2 H_2O

  +0,1 g $MgCl_2$x6H_2O

  ad 1000 ml Aqua Dest.

  1 n NaOH ad pH 7,4

  +10 ml $CaCl_2$-Lösung (1,5g $CaCl_2$ ad 100 ml Aqua Dest.)

• RPMI 1640 Medium, Boehringer (Mannheim, Deutschland)

• Waymouth MB 752/1-Medium, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

2.1.2. Reagenzien und Pharmaka

• A 23187 free acid, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

• $AACOCF_3$, Calbiochem (La Jolla, USA)

• Acetonitril (CH_3CN), geeignet für HPLC, Fluka (Bern, Schweiz)

• Ameisensäure (HCOOH), pro analysi, Merck (Darmstadt, Deutschland)

• Ammoniakalische Lösung (NH_4OH) 25%, pro analysi, Merck (Darmstadt, Deutschland)

• Ammoniumformiat (NH_4FO), aus Ameisensäure und Ammoniakalischer Lösung hergestellt

• Aqua Tridestillata, im Milli-Q Wasseraufbereitungssystem entionisiert und gefiltert, Millipore (Eschborn, Deutschland)

• Arachidonsäure (all-cis-5, 8, 11, 14-Eicosatetraen-Säure; C20:4:6), Calbiochem (La Jolla, USA)

• Aspisol (D,L-Lysin-mono-acetylsalicylat/Glycin), Bayer (Leverkusen, Deutschland)

• Borax (Phosphoglycerolinositol), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

• Chromogenes Substrat S-2484 (L-Pyroglutamyl-L-Propyl-L-Valine-P-Nitroanilide), Chromogenix (Mölndal, Schweden)

• Diethylether (C_2H_5-O-C_2H_5), Merck (Darmstadt, Deutschland)

• DMSO (Dimethylsulfoxid), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

• EDTA Na_2x2H_2O (Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium-Dihydrat), Merck (Darmstadt, Deutschland)

• Eicosapentaensäure (all-cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaen-Säure; C20:5:3), Calbiochem (La Jolla, USA)

- Eisessig, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ficoll-Paque, Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
- FMLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- [^{111}In]-Chlorid, Amersham Buchler (Braunschweig, Deutschland)
- Isopropanol ($CH_3CHOHCH_3$), geeignet für HPLC, Fluka (Bern, Schweiz)
- Liquemin 25.000:5000 IE/ml (Na-Heparin), Hoffman La Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- Lithiumchlorid, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Methanol (CH_2OH) destilliert in Glas, geeignet für HPLC, Burdick & Jackson Lab. Inc.; Vertrieb durch Fluka (Bern, Schweiz)
- Myoinositol, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Myo-[^{3}H]-Inositol, Amersham Buchler (Braunschweig, Deutschland)
- NaCl 0,9%, Braun (Melsungen, Deutschland)
- NaOH, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Polyvinylalkohol 72000, Merck Schuchard (Hohenbrunn, Deutschland)
- Salzsäure 32%, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Stickstoff 4.0, Messer Griesheim (Krefeld, Deutschland)
- TNF-α, Coulter-Immunotech (Hamburg, Deutschland)
- Trichloressigsäure, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Triethylamin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Trispuffer (Trometamol), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Triton-X (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Tropolone (2-Hydroxy-2,4,6-Cycloheptatrienone), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Tween 80 (Polyoxyethylensorbitmonooleat), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

2.1.3. Authentische Standards

- LTB_4, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- LTC_4, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- LTD_4, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- LTE_4, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- 5-HETE, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- 12-HETE, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- 15-HETE, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- LTB_5, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- LTC_5, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- LTD_5, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- LTE_5, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- 5-HEPE, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- 12-HEPE, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- 15-HEPE, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

2.1.4. Sonstige Materialien

- Dowex-1 Anionenaustauscherharz-Säulen, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Festphasen-Vorsäulen Chromabond C18ec, Varian (Frankfurt/Main, Deutschland)
- HPLC- Säule, Shandon (Frankfurt/Main, Deutschland)
- Octadecylsilyl (ODS)-Hypersil (3 µM), Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
- Szintillator Rotiszint Eco Plus, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Zellkulturplatten, 12-Well und 24-Well, Costar (Cambridge, USA)
- Zentrifugenröhrchen 14 ml und 50 ml, Polypropylen, Falcon, über Becton Dickinson (Meylan

Cedex, Frankreich)

2.1.5. Geräte

- Absorbance Detector Spectroflow 773, Kratos, über BAI (Weiterstadt, Deutschland)
- Beta-Szintillationscounter 1900 TR, Canberra Packard (Dreieich, Deutschland)
- CO_2-Inkubator IR 1500, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Flow-Arbeitsbank, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Gamma-Counter Cobra Auto-Gamma, Canberra Packard (Dreieich, Deutschland)
- High Precision Pump Modell 300 C (Gradientenpumpe), Gynkothek (München, Deutschland)
- Integrator C-R3A, Gynkothek (München, Deutschland)
- Mikroskop IMT-2, Olympus Optical Co.(Hamburg, Deutschland)
- Pipetten, Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg, Deutschland)
- PH-Meter Delta 320, Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
- Photodiode Array Detector Model 990, Waters (Eschborn, Deutschland)
- Photometer Uvikon 860, Kontron Instruments (Zürich, Schweiz)
- Präzisionsspritze 50 µl, Hamilton (Darmstadt, Deutschland)
- Probenaufgabeventil Modell 7125, Rheodyne, über Latek (Eppelheim, Deutschland)
- Vorsäulenkammer, Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
- Waage PB 303 und H 20 T, Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
- Wasseraufbereitungsanlage Milli Q, Millipore (Eschborn, Deutschland)
- Zentrifuge RPC Rotanta, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation humaner Granulozyten

Die Isolation humaner Polymorphkerniger Granulozyten (PMN) erfolgte unter sterilen Arbeitsbedingungen mit Hilfe eines Ficoll-Paque Gradienten nach der Methode von Boyum (44). Das Prinzip der Trennung einzelner Zelltypen durch einen Dichtegradienten beruht auf deren unterschiedlichen Sedation durch den Gradienten bei der Zentrifugation: Während Monozyten und Lymphozyten sich in der oberen Schicht des Gradienten sammeln, wandern Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte durch ihn hindurch.

Bei freiwilligen Spendern wurde aus der Cubitalvene Blut entnommen und im Verhältnis 1:2 mit PBS-Puffer (ohne Calcium und Magnesium) verdünnt. Das verdünnte Blut wurde auf Ficoll-Paque-Gradienten aufgeschichtet und bei 350 x g 35 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurden die oberen Phasen (Serum, Mononukleäre Zellen, Ficoll-Gradient) abgenommen und verworfen. Die unterste Phase, bestehend aus Erythrozyten und Granulozyten wurde im Verhältnis 1:3 verdünnt mit Polyvinylalkohol (PVA) und gut durchmischt. Nach 15 Minuten Sedimentationszeit für die Erythrozyten wurde wiederum die obere Phase (PVA und PMN) abgenommen und in ein neues Gefäß gegeben, die sedimentierten Erythrozyten wurden verworfen. Nach anschließender Zentrifugation bei 250 x g für 10 Minuten und absaugen des PVA-Überstandes verblieb ein granulozytenreiches Pellet. Es folgte die hypotone Lyse der restlichen Erythrozyten mit eisgekühltem Aqua Dest. für 20 Sekunden. Der Ansatz wurde wiederum bei 250 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, das Erythrozyten-freie PMN-Pellet in PBS-Puffer (ohne Calcium und Magnesium) resuspendiert. Jetzt konnte die Zahl der PMN lichtmikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer bei 400facher Vergrößerung bestimmt werden. Nach erneuter Zentrifugation (250 x g, 10 Minuten) wurden die PMN in RPMI 1640 Medium gegeben und ca. 30 Minuten im CO_2-Inkubator aufbewahrt. Zum Einsatz im Versuch wurden die

PMN erneut zentrifugiert und anschließend in 600 µl Hanks/HEPES- Puffer (mit Calcium und Magnesium) je 10 Mio. Zellen aufgenommen.

Die Reinheit der isolierten Granulozyten wurde in regelmäßigen Abständen durch manuell durchgeführte Differentialblutbilder kontrolliert. Diese ergaben einen PMN-Anteil von ca. 97%.

2.2.2. Vorbereitung und Inkubation der Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden aus Umbilikalvenen nach der Methode von Jaffe et al. (45) isoliert und als Monolayer auf 12- bzw. 24-Well Zellkulturplatten angezüchtet. Die Monolayer wurden vor Versuchsbeginn mikroskopisch auf gleichmäßiges, dichtes Wachstum und Zellintegrität geprüft. Anschließend wurde der Überstand des Nährmediums (Waymouth-Medium) abgesaugt und die Zellen 2 mal mit je 1 ml Hanks/HEPES-Puffer pro Well gewaschen. Pro Well wurde 1 ml Hanks/HEPES-Puffer vorgelegt und die Zellen - je nach Versuchsansatz - wahlweise mit freier Arachidonsäure oder Eicosapentaensäure in verschiedenen Konzentrationen beschickt. Die Fütterung mit freier Fettsäure erfolgte 4 mal in 2 Stunden (Zeitpunkte 0, 30', 60', 90'). Die Zellen wurden während dieser Zeit im Wasserbad bei 37°C aufbewahrt. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen erneut 2 mal mit je 1ml Hanks/HEPES-Puffer pro Well gewaschen. Danach wurden 850 µl Hanks/HEPES-Puffer pro Well vorgelegt.

2.2.3. Versuchsprotokoll

Je Well wurden 150 µl der PMN-Suspension hinzugefügt, was einer PMN-Konzentration von 2,5 Mio. Zellen pro Well entspricht. Der Ansatz wurde im Wasserbad bei 37°C zunächst für 15' aufbewahrt, um eine Sedimentation der PMN auf die Endothelzellschicht zu ermöglichen.

Anschließend wurde mit 1 µM A 23187 pro Well stimuliert und der Versuchsansatz nach 15' durch Kühlung der Platten auf Eis abgestoppt. Die Überstände der Wells wurden abpipettiert und in Eppendorfcups gegeben, es folgte eine Zentrifugation bei 10000 U/min für 3 Minuten, um Zellüberreste zu beseitigen. Vom Überstand wurden 100 µl für die Messung der Elastaseaktivität abgenommen, die restlichen 900 µl wurden für die weiteren Messungen bei -20° C aufbewahrt.

2.2.4. Inhibition der Cyclooxygenase und der Phospholipase A_2

Die Inhibition der Cyclooxygenase wurde mit Acetysalicylsäure (Aspisol®) vorgenommen. Diese wurde in einer Konzentration von 250 µM wahlweise gleichzeitig mit der Zugabe der PMN oder vor der Fettsäureinkubation zu den HUVECs gegeben, was einer Einwirkzeit der Acetylsalicylsäure von 30 bzw. 150 Minuten entspricht.

Die Hemmung der Phospholipase A_2 wurde mit $AACOCF_3$ durchgeführt, das durch direkte Bindung an das Enzym seine inhibitorische Wirkung entfaltet (46). Zur Inhibition der Endothelzellphospholipase A_2 wurde $AACOCF_3$ in einer Konzentration von 100 µM nach dem Waschen der HUVECs und noch vor der Zugabe der freien Fettsäure auf die Wells gegeben. Die weitere Vorgehensweise entsprach der oben beschriebenen Versuchsdurchführung.

2.2.5. Messung der Elastaseaktivität

Zur quantitativen Erfassung der Degranulationsreaktion der Granulozyten wurde die Aktivität der Elastase, eines proteolytischen Enzyms, im Zellüberstand gemessen. Die Enzymaktivität wurde photometrisch bei 405 nm Wellenlänge bestimmt (Methode nach Kramps, 47). Meßzelle und Reagenzien wurden auf 37°C temperiert. Zur Messung wurden 100µl Probenvolumen mit 100µl Verdünnungspuffer und je 200µl Meßpuffer und chromogenes Substrat S-2484

in der Küvette gut durchmischt. Nach 60 Sekunden Inkubationszeit im Photometer wurde anhand von 20 Messungen der Extinktionszunahme über 3 Minuten die Enzymkinetik bestimmt.

2.2.6. Analytik der Lipoxygenaseprodukte

Die quantitative Erfassung der Lipoxygenaseprodukte erfolgte mittels High-Performance Liquid Chromatography. Die entsprechende Methodik wurde etabliert von Kiss et al. (48).

2.2.6.1. Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion erfolgte mit Chromabond C18ec-Vorsäulen (100 mg ODS, 1 ml Probenvolumen), die auf einer Vakuumkammer installiert wurden. Die Vorsäulen wurden zunächst konditioniert mit Lösung A (s. Tabelle 1). Nach zweimaligem Waschen der Säulen mit Aqua Tridestillata erfolgte die Äquilibration mit Lösung B. Die Proben wurden in 1 ml der HPLC-Phase aufgenommen und die vorbereiteten Vorsäulen damit beschickt. Es folgten Reinigungsschritte mit Lösung B (4x 1 ml) und Spülung mit Aqua Tridestillata (3x 1 ml), um eventuelle Verunreinigungen in den Proben zu beseitigen. Anschließend wurden die Eicosanoide mit 1 ml der Lösung A eluiert. Das Eluat wurde in Spitzbodenvials aufgefangen, zum Trocknen mit Stickstoff abgeblasen und bei -20°C gelagert. Zum Aufspritzen wurden die Proben in 50 µl HPLC-Phase aufgenommen, davon wurden 20 µl aufgespritzt.

2.2.6.2. Reversed-Phase HPLC

Als mobile Phase wurde eine Acetonitril-Methanol-Wasser-Lösung verwendet (s. Tabelle 1), die vor der Verwendung durch eine Teflonmembran filtriert und im Ultraschallbad entgast wurde. Bei der Herstellung der mobilen Phase kamen ausschließlich Reagenzien in

„HPLC-Qualität" zur Anwendung. Als feste Phase diente eine mit 3 µm ODS-Hypersil gepackte Säule (Länge 25 cm, Innendurchmesser 4,6 mm). Diese wurde zunächst konditioniert mit Aqua Tridestillata (1 h) und 1 mM EDTA Na_2 in Methanol:Wasser (10:90) (2 h). Anschließend erfolgte die Äquilibration des Systems mit HPLC-Phase.

Nach Aufspritzen der Proben erfolgte die Messung bei 270 nm Wellenlänge für Leukotriene (15 Minuten), anschließend bei 237 nm für HETEs und HEPEs. Die Flow-Rate betrug 1 ml/h. Zusätzlich wurden die Eicosanoide mit einem Photodioden Array identifiziert, der die Messung des vollen UV-Spektrums erlaubte (190-340 nm). Eine Koelution mit eventuellen Verunreinigungen konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden.

Reagentien	Lösung A	Lösung B	Mobile Phase
Aqua Tridest.	5,0	83,0	38,0
Methanol	95,0		8,0
Isopropanol		9,0	
Ameisensäure	0,002	1,7	0,001
Triethylamin		6,3	
Acetonitril			54,0
pH	4,5	5,0	4,38

Tabelle 1: Zusammensetzung der Lösungen für die Reversed Phase HPLC. Angaben in Volumenprozent.

Zur Ermittlung der Recovery der einzelnen Eicosanoide mit dem verwendeten HPLC-System wurden authentische Standards in unterschiedlichen Konzentrationen aufgespritzt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Standard	Recovery (% +/- SEM)
6t-LTB_4 + 6t,12e-LTB_4	92,0 ± 3,1
LTB_4	90,8 ± 1,4
5-HETE	71,9 ± 4,1
6t-LTB_5 + 6t,12e-LTB_5	86,4 ± 1,9
LTB_5	87,8 ± 2,8
5-HEPE	76,1 ± 3,6

Tabelle 2: Recovery-Daten aus 6 unabhängigen Versuchen. Angaben in Prozent.

2.2.7. Messung der Adhärenz

Die Messung der Adhärenz von PMN auf HUVECs erfolgte mittels radioaktiver Markierung der PMN mit [^{111}In]-Tropolonat nach der Methode von Danpure, Osman und Brady (49).

Zur Herstellung des Indium-Tropolonat-Komplexes wurde [^{111}]In-Chlorid der Firma Amersham zunächst in 0,04 M Salzsäure verdünnt auf eine Konzentration von 4 µCi/ml. Diese Lösung wurde im Verhältnis 1:10 mit Tropolone gemischt und 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C aufbewahrt.

Die Isolation der PMN erfolgte wie oben beschrieben. 70 Mio. PMN wurden anschließend in 3ml HBS-Puffer suspendiert und 300 µl des Indium-Tropolonat-Komplexes zugegeben. Diese Suspension wurde weitere 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Es folgten 2 Waschschritte mit HBS-Puffer in der Zentrifuge (300 x g für 5 Min.).

Die radioaktiv markierten PMN wurden auf HUVECs gegeben (Zellzahl 2,5 Mio. pro Well), die vorher mit 1 ng TNF-α pro Well für 2 Stunden inkubiert worden waren. Nach 15 Minuten Sedimentationszeit wurde mit 0,1 µM FMLP pro Well für 15 Minuten stimuliert. Der Ansatz wurde auf Eis abgestoppt und die Überstande abpipettiert. Zusätzlich wurden die auf den

Wells verbliebenen Zellen mit 0,5%igem Triton-X lysiert und mit einem Cell-Scraper aus den Wells entfernt. Die Aktivität sowohl im Probenüberstand, als auch in den lysierten Zellen wurde im Gamma-Counter ermittelt, so daß, ausgehend von der Gesamtaktivität des Ansatzes, der Prozentsatz der auf den HUVECs adhärenten PMN errechnet werden konnte.

2.2.8. Analytik der Inositolphosphate

Phosphatidylinositole sind Bestandteile der Zellmembran. Sie dienen als "Second Messenger", die Signale im Zellinneren weiterleiten, die an der Zellmembran, z.B. durch Rezeptorbindung von Hormonen, entstehen. Dabei wird Phosphatidylbisphosphat der Zellmembran zu Inositoltrisphosphat (IP_3) hydrolysiert. Die Freisetzung der Inositolphosphate ist streng an die Aktivität der Phospholipase C gebunden.

2.2.8.1. Prinzip der Methode

Die Messung der IP_3-Freisetzung erfolgte nach der Methode von Berridge et al. (50). Dazu wurden zunächst die Inositolphosphate der PMN mit [^{3}H]-beladenem Inositol markiert. Durch Stimulation der Zellen wurde die IP_3-Freisetzung initiiert. Da IP_3 normalerweise bis zum Inositol schrittweise dephosphoryliert wird, wurde das letzte Enzym dieser Abbausequenz, die IP_1-Phosphatase mit Lithium-Ionen gehemmt. Auf diese Weise konnte eine Akkumulation der Inositolphosphate im Cytoplasma erreicht werden. Nach Lyse der Zellmembranen wurde die Lipidfraktion mit den in der Zellmembran verbliebenen Phosphatidylinositolen abgetrennt und die Menge der freigesetzten Inositolphosphate in der wässrigen Phase des Cytoplasmas quantitativ erfaßt (IP_x= IP_1+IP_2+IP_3).

2.2.8.2. Versuchsablauf

70 Mio. der Granulozyten wurden nach der Isolation in 700 µl RPMI 1640-Medium suspendiert. Nach Zugabe von 50 µl [^{3}H]-Inositol (entsprechend 50 µCi) wurde der Ansatz für eine Stunde im CO_2 -Inkubator aufbewahrt. Anschließend wurde das nicht von den Granulozyten inkorporierte [^{3}H]-Inositol in 3 Zentrifugationsschritten mit PBS-Puffer ohne Calcium und Magnesium (je 5 Min. bei 250 x g) abgewaschen. Die so vorbehandelten PMN wurden in 600 µl PBS-Puffer mit Calcium und Magnesium pro 10 Mio. Zellen aufgenommen und je 150 µl dieser Suspension auf jedes Well gegeben. Zusätzlich wurde dem Ansatz 10 mM Lithiumchlorid zugefügt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit erfolgte die Stimulation mit 10 µM FMLP. Abgestoppt wurde die Reaktion mit je 1ml 15%iger Trichloressigsäure in einer Zeitreihe, nämlich nach 30 Sekunden, 1, 3, 5 und 10 Minuten. Der Probenüberstand wurde abgenommen und bei 10000 u/min für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben zur Abtrennung der Lipidphase 3 mal mit je 2 ml Diethylether ausgeschüttelt.

Die Extraktion der Inositolphosphate erfolgte mit Hilfe der Ionen-austausch-Chromatographie. Dazu wurden die mit Dowex-Ionenaustauscherharz gepackten Chromatographiesäulen zunächst mit je 4 ml Ammoniumformiat konditioniert und mit je 5 ml Aqua Dest. gewaschen. Nach Zugabe der Proben erfolgten Auswasch- und Reinigungsschritte mit je 3 ml Myoinositol und je 5 ml Borax. Nun wurde mit je 4 ml Ammoniumformiat eluiert. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit Szintillator durchmischt. Nach 2 Std. Ruhezeit für den Szintillator wurde die Aktivität der Proben im ß-Counter gemessen.

2.2.9. Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz der Daten wurde mit dem gepaarten T-Test für normalverteilte Proben ermittelt. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluß der Vorinkubation von Endothelzellen mit Eicosapentaensäure versus Arachidonsäure auf die Immunantwort koinkubierter PMN

3.1.1. Degranulationsreaktion

Die im Zellüberstand gemessene Elastaseaktivität von A 23187-stimulierten PMN allein lag bei 1,4 ± 0,1 U/l. Durch Koinkubation von PMN mit HUVECs stieg die Aktivität der Elastase auf 6,1 ± 0,6 U/l. Die zusätzliche vorherige Zufuhr von freier Arachidonsäure bewirkte einen weiteren Anstieg der Elastaseaktivität um maximal 18% auf 7,2 ± 0,5 U/l. Der maximale Anstieg ergab sich bei Inkubation der Endothelzellen mit 1 µmol/l Arachidonsäure. Im Gegensatz dazu konnte die Aktivität der Elastase durch vorherige Inkubation der Endothelzellen mit Eicosapentaensäure um maximal 15% auf 5,3 ± 0,5 U/l gesenkt werden, verglichen mit der Koinkubation ohne Fettsäurezufuhr. Dabei war der maximale Effekt ab einer Zufuhr von mindestens 5 µmol/l Eicosapentaensäure zu beobachten. Verglichen mit den Werten bei Inkubation mit Arachidonsäure war die Elastaseaktivität bei Inkubation mit Eicosapentaensäure bis zu 31% niedriger. Der Unterschied der Daten war signifikant ($p<0,05$) für die Versuche mit 1 bzw. 5 µmol/l freier Fettsäure (Abb. 4). Das Gesamtniveau der Elastasedegranulation differierte dabei zum Teil zwischen den einzelnen Versuchsreihen, die Werte der EPA-Ansätze lagen jedoch stets niedriger als die der AA-Ansätze innerhalb eines Versuches.

3.1.2. Produktion von Lipoxygenasemetaboliten

Die im Zellüberstand gemessene Freisetzung von LTB_4 durch PMN ohne HUVECs lag bei 42,2 ± 5 nmol/l. Nur unwesentlich steigern ließ sich die LTB_4-Produktion durch alleinige Koinkubation mit HUVECs ohne Zufuhr freier Fettsäuren. Dagegen stieg die LTB_4-Freisetzung in Versuchen mit vorheriger Zufuhr freier Arachidonsäure um max. 36% auf 58,5 ± 2,7 nmol/l an, bei Zufuhr von freier Eicosapentaensäure war jedoch nur ein geringfügiger Anstieg um max. 12% auf 47,2 ± 2,2 nmol/l zu messen. (Abb. 5). Die LTB_4-Ausschüttung nach Inkubation mit EPA war ab einer Konzentration von 1 μmol/ signifikant niedriger als nach Inkubation mit AA ($p<0,05$), die maximale Differenz zwischen AA- und EPA-Werten lag bei 11,3 nmol/l.

Ein ähnlicher Effekt konnte bei der Messung von 5-HETE beobachtet werden. Hier lag der maximale Anstieg unter Zufuhr von AA sogar bei max. 80% gegenüber Versuchen ohne Fettsäure, während unter EPA-Gabe nur ein Anstieg um max. 39% auftrat. Ein signifikanter Effekt konnte bei einer Konzentration von 5 μmol/l freier Fettsäure gezeigt werden (Abb. 6).

Im Gegensatz dazu lag die Menge an nichtenzymatischen Zerfallsprodukten des LTA_4 bei Vorinkubation mit AA und EPA auf gleichem Niveau. Lediglich gegenüber Versuchen ohne Zufuhr freier Fettsäure ließ sich eine Steigerung der Zerfallsprodukte auf maximal fast die doppelte Menge messen. Dabei war ein linearer Anstieg der Zerfallsprodukte mit steigenden Konzentrationen zugeführter freier Fettsäure zu beobachten (Abb. 7).

Parallel zum verminderten Auftreten von Produkten der 4er-Reihe erschienen unter Zufuhr von EPA die 5er-Produkte der Lipoxygenase. Quantitativ lagen diese in einem Bereich von 16% (LTB_5) bis 47% (5-HEPE) der Mengen an gemessenen 4er-Produkten. Bei Versuchen mit AA-Zufuhr waren dagegen keine 5er-Produkte messbar (Abb. 8).

3.1.3. Adhärenz von PMN an EC

Zum Vergleich der Adhärenz von PMN an HUVECs, die mit AA, EPA oder nicht mit freier Fettsäure vorinkubiert worden waren, wurden Versuchsreihen mit steigenden Konzentrationen an zugeführter freier Fettsäure durchgeführt. Ohne Stimulation und ohne vorherige Inkubation mit freier Fettsäure wurden 28 ± 4% der PMN adhärent. Dieser Prozentsatz stieg auf knapp 59 ± 6% bei Stimulation mit FMLP. Wurden die HUVECs mit AA vorinkubiert und anschließend mit FMLP stimuliert, sank die Adhärenz mit steigender Konzentration freier Fettsäure leicht ab auf Werte von 57 bis 49 ± 4%. Auf HUVECs, die mit EPA vorinkubiert worden waren, lag der Anteil adhärenter PMN dagegen bis zu 21% niedriger als in den Versuchen mit AA-Inkubation. Dieser Effekt war statistisch signifikant ($p<0,05$) für die Versuche mit 0,1, 0,5 und 5 µmol/l freier Fettsäure (Abb. 9).

3.1.4. Inositolphosphatbildung

Der Einfluß einer Vorinkubation von HUVECs mit AA bzw. EPA auf die Bildung von Second Messengern in PMN wurde anhand der quantitativen Erfassung der Abbauprodukte von Inositoltrisphosphat bestimmt. In Versuchen, in denen die EC mit 1 µmol/l AA inkubiert wurden, verzögerte sich der charakteristische frühe Peak der Inositolphosphatbildung um etwa eine halbe Minute und war um 5% höher als in den Versuchen, in denen keine freie Fettsäure zugeführt wurde (Abb. 10). Im Vergleich dazu verzögerte sich das Maximum der Inositolphosphatbildung in EPA-vorinkubierten Versuchen um über 4 Minuten, ein früher Peak war nicht mehr zu erkennen. Vielmehr zeigten diese Versuche einen verzögerten Anstieg der Inositolphosphate über 5 Minuten hinweg (Abb. 11).

3.2. Auswirkung der selektiven Inhibition zweier Enzyme auf Degranulationsreaktion und Produktion von Lipoxygenasemetaboliten durch PMN am Inkubationsmodell

3.2.1. Cyclooxygenaseinhibition

Die Hemmung der Cyclooxygenase von PMN und HUVECs mit 250 µmol/l Acetylsalicylsäure wurde in zwei Versuchsreihen durchgeführt: In einer ersten Reihe wurde die Inhibition über 30 Minuten, in einer zweiten Reihe über 150 Minuten hinweg durchgeführt. Dabei ergaben sich nur minimale Effekte gegenüber den Versuchsreihen ohne Cyclooxygenaseinhibition. Bei der Messung der Elastaseaktivität fiel ein leicht erhöhter Wert bei Versuchen ohne Zufuhr freier Fettsäure auf, ansonsten konnte kein wesentlicher Effekt festgestellt werden (Abb. 12). Die quantitative Messung der Lipoxygenaseprodukte zeigte eine minimale Annäherung der Werte für Versuche mit Arachidonsäure und Eicosapentaensäure sowie Versuche ohne Zufuhr freier Fettsäure, dies jedoch nur bei Inhibition über 150 Minuten. Bei Inhibition über 30 Minuten konnte kein signifikanter Effekt gezeigt werden (Abb. 13-15). Auch die Menge und das Profil der 5er-Produkte in Versuchen mit EPA-Zufuhr blieben in diesen Versuchsreihen unberührt (Abb. 16).

3.2.2. Inhibition der Phospholipase A_2

Unter Inhibition der Phospholipase A_2 der HUVECs mit 100µmol/l $AACOCF_3$ ergab sich folgendes Bild: Die Elastaseaktivität sank auf Werte, die 25-40% unter den Werten ohne Inhibition lagen (Abb. 17). Die LTB_4-Produktion lag ebenfalls zwischen 20 und 40% niedriger als die Vergleichswerte. Signifikante Unterschiede zwischen AA-, EPA- und Versuchen ohne

freie Fettsäure waren nicht mehr auszumachen (Abb. 18).

Die Menge an nichtenzymatischen Zerfallsprodukten und 5-HETE sank um vergleichbare Werte wie die LTB_4-Menge, hier blieben die Differenzen zwischen den verschiedenen Versuchsreihen aber erhalten: Die Werte der Versuche ohne Zufuhr freier Fettsäure waren niedriger als die der Versuche mit AA-Zufuhr, aber höher als die der Versuche, in denen EPA zugeführt wurde (Abb. 19, 20). 5er-Produkte blieben nachweisbar, ihre Menge sank jedoch auf 65% (LTB_5), 27% (6-trans(-12-epi)-LTB_5) bzw. 42% (5-HEPE) der Ausgangswerte ab (Abb. 21).

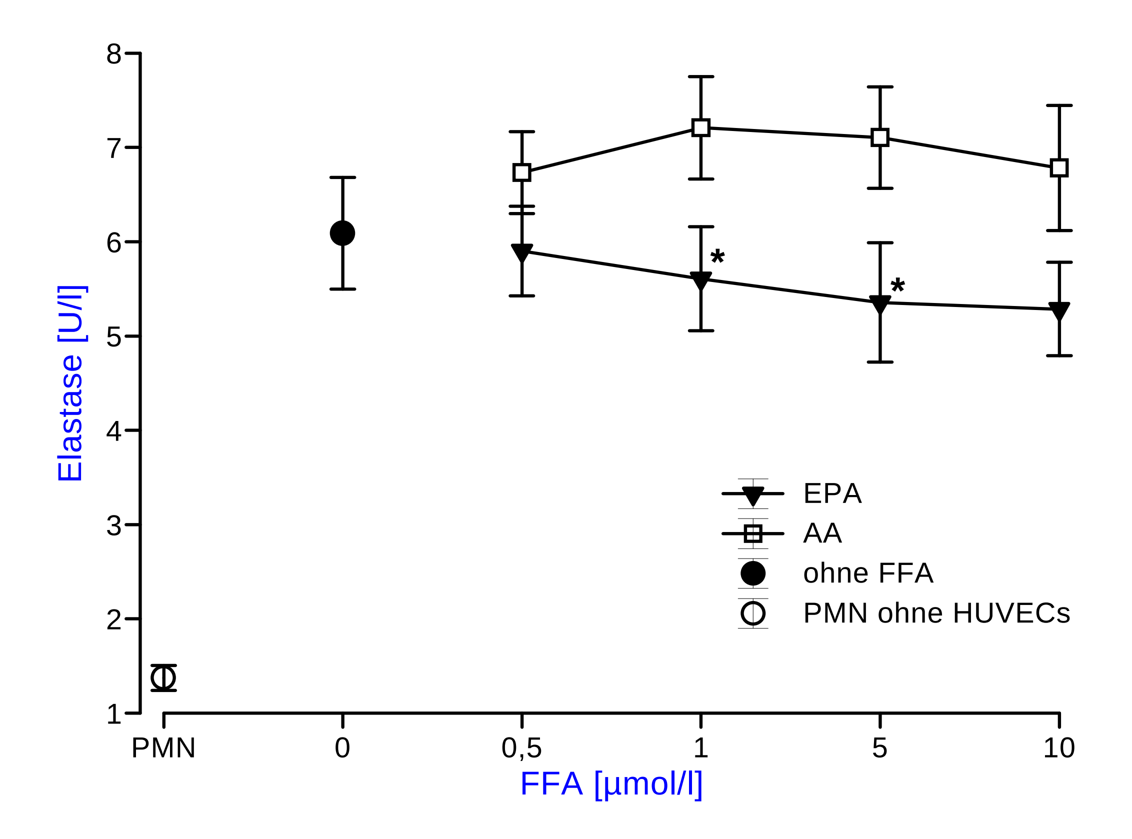


Abbildung 4: Änderung der Elastaseaktivität im Zellüberstand nach vorheriger Inkubation der Endothelzellen mit steigenden Konzentrationen freier Arachidonsäure bzw. Eicosapentaensäure. Stimulation mit 1 µmol/l A 23187. Alle Daten ± SEM, n=8. P<0,05 für mit “*” gekennzeichnete Datenpaare.

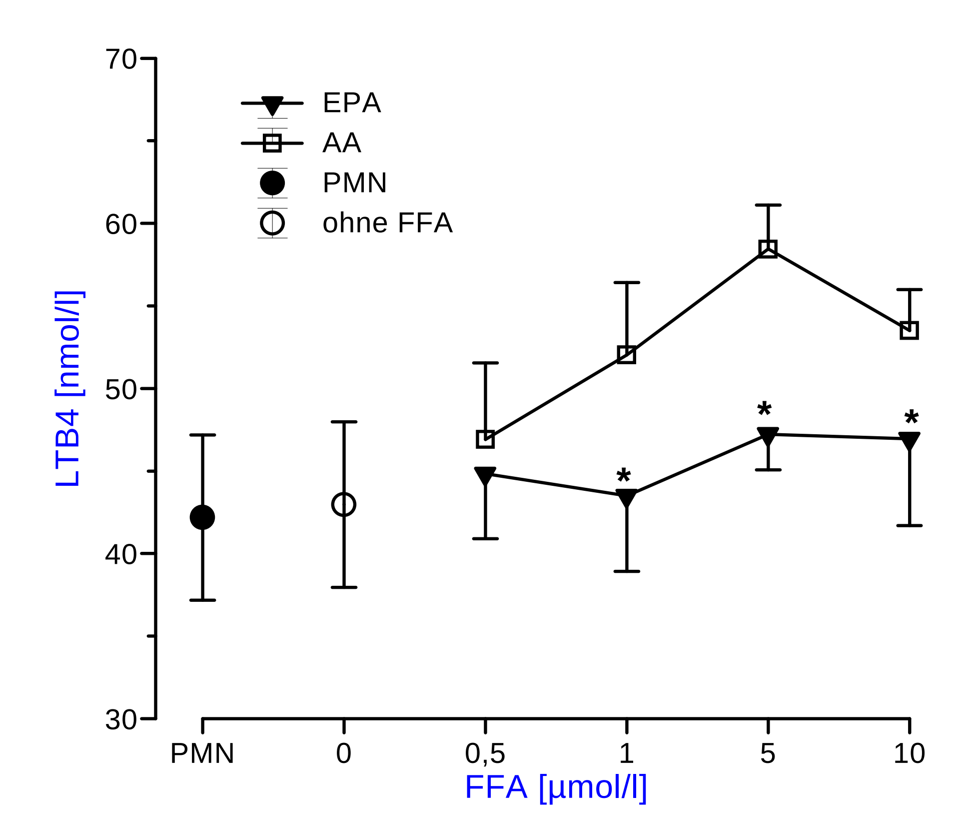


Abbildung 5: LTB_4-Ausschüttung in den Zellüberstand nach vorheriger Inkubation der Endothelzellen mit steigenden Konzentrationen freier Arachidonsäure bzw. Eicosapentaensäure. Stimulation mit 1 µmol/l A 23187. Alle Daten ± SEM, n=6. P<0,05 für mit "*" gekennzeichnete Datenpaare.

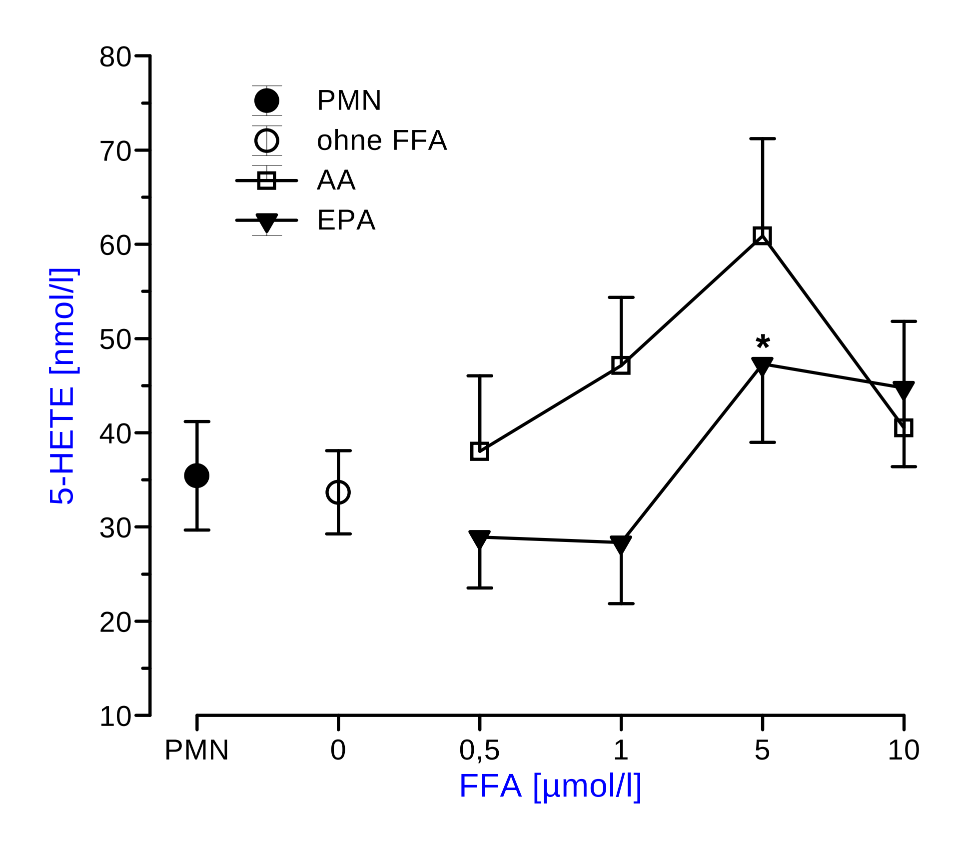


Abbildung 6: Ausschüttung von 5-HETE in den Zellüberstand. Stimulation mit 1 µmol/l A 23187. Alle Daten ± SEM, n=3. P<0,05 für mit “*” gekennzeichnete Datenpaare.

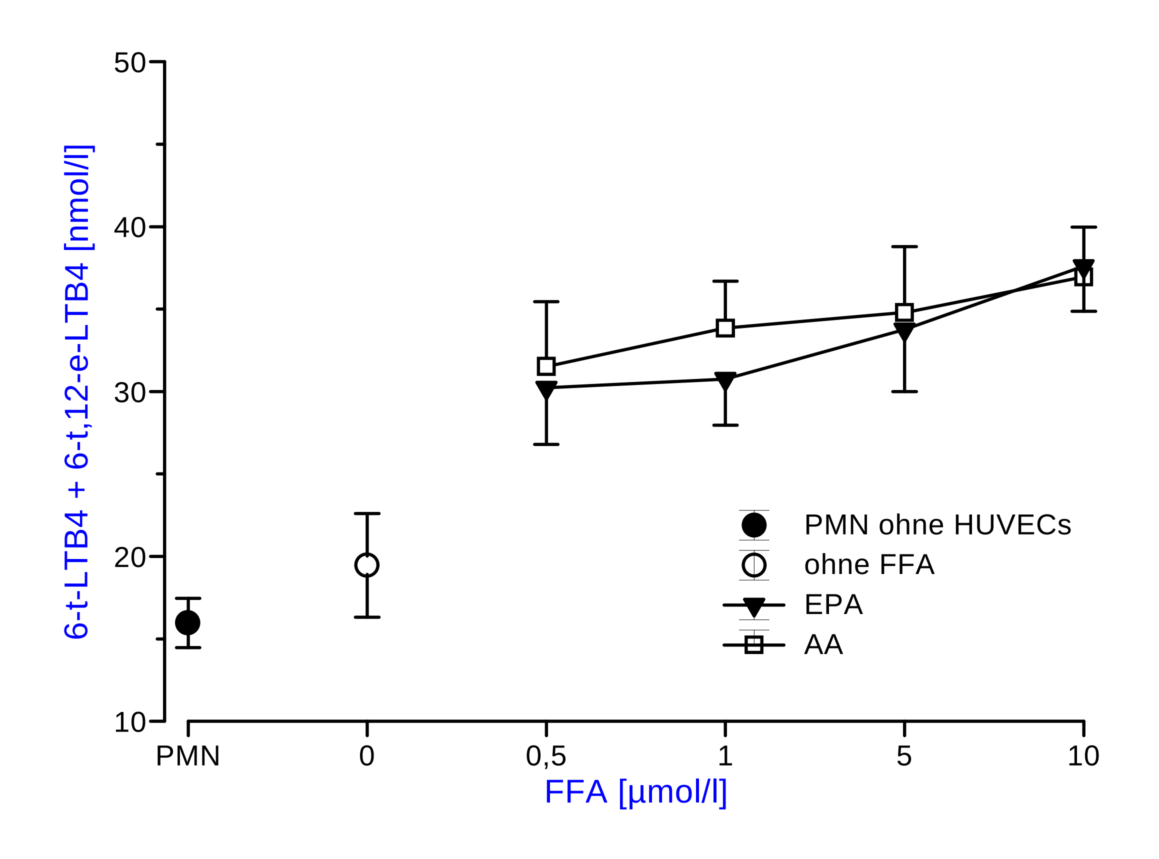


Abbildung 7: Ausschüttung der LTA_4-Zerfallsprodukte (6-trans- und 6-trans, 12-epi-LTB_4) in den Zellüberstand. Stimulation mit 1 µmol/l A 23187. Alle Daten ± SEM, n=5.

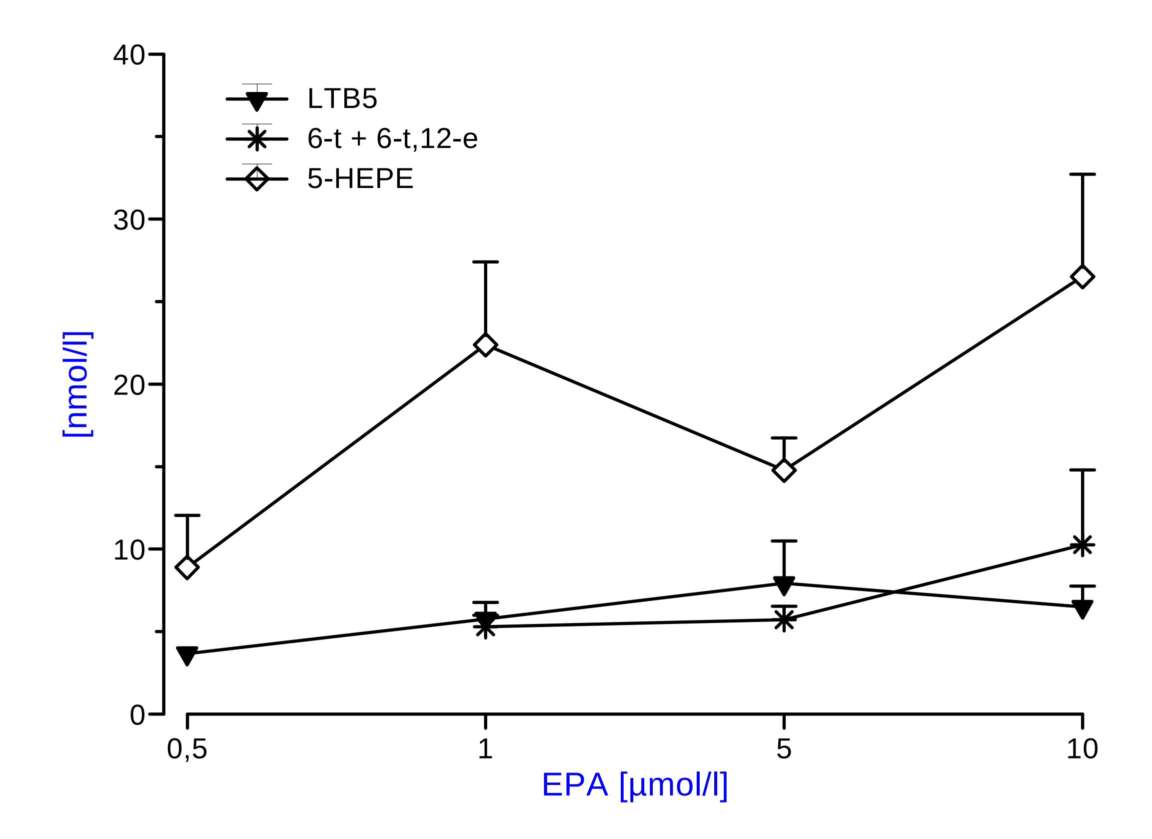


Abbildung 8: Synthese von EPA-abgeleiteten Produkten der 5-Lipoxygenase durch PMN nach vorheriger Inkubation der Endothelzellen mit steigenden Konzentrationen freier Eicosapentaensäure. Stimulation mit 1 µmol/l A 23187. Alle Daten ± SEM, n=4.

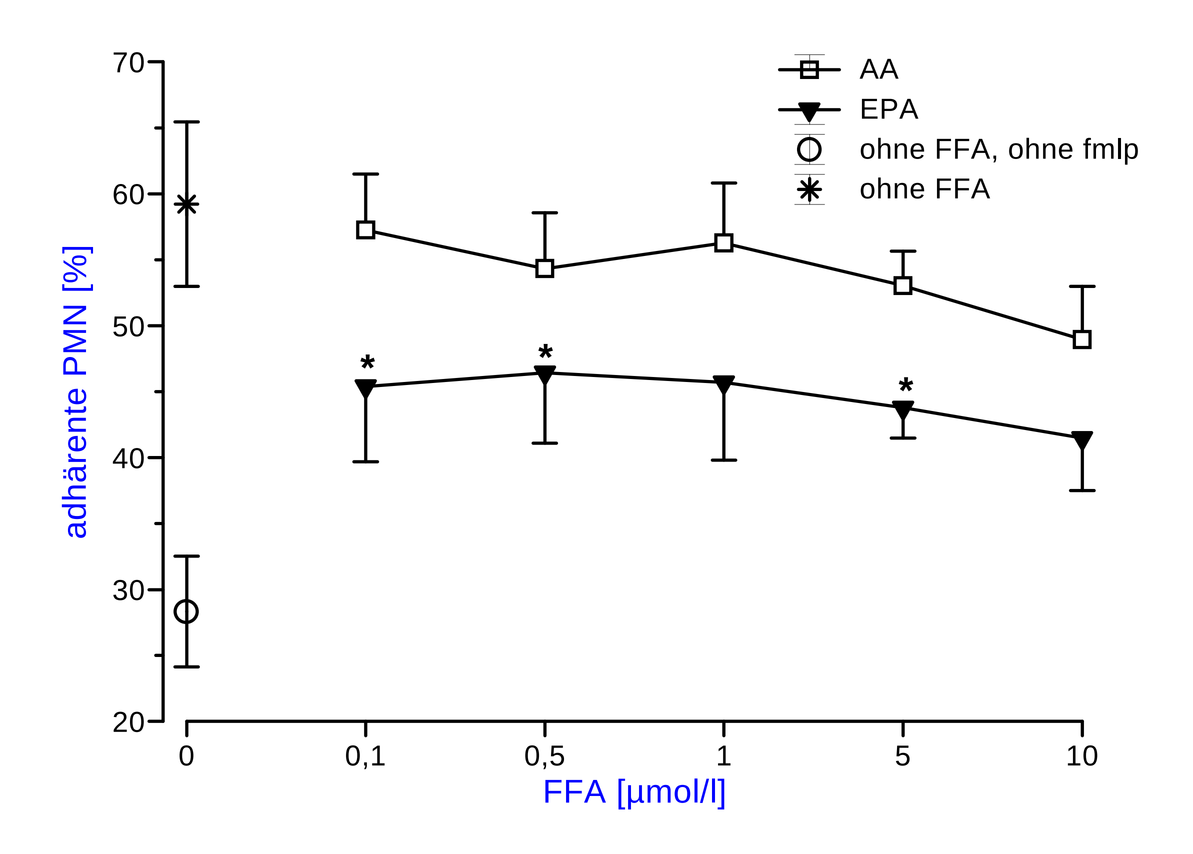


Abbildung 9: Adhärenz von PMN an EC nach vorheriger Inkubation der EC mit steigenden Konzentrationen freier Arachidonsäure bzw. Eicosapentaensäure. Priming der EC mit TNF-α. Stimulation mit 0,1 µmol/l FMLP. Alle Daten ± SEM, n=5 für AA und EPA, n=4 ohne FFA. P<0,05 für mit “*” gekennzeichnete Datenpaare.

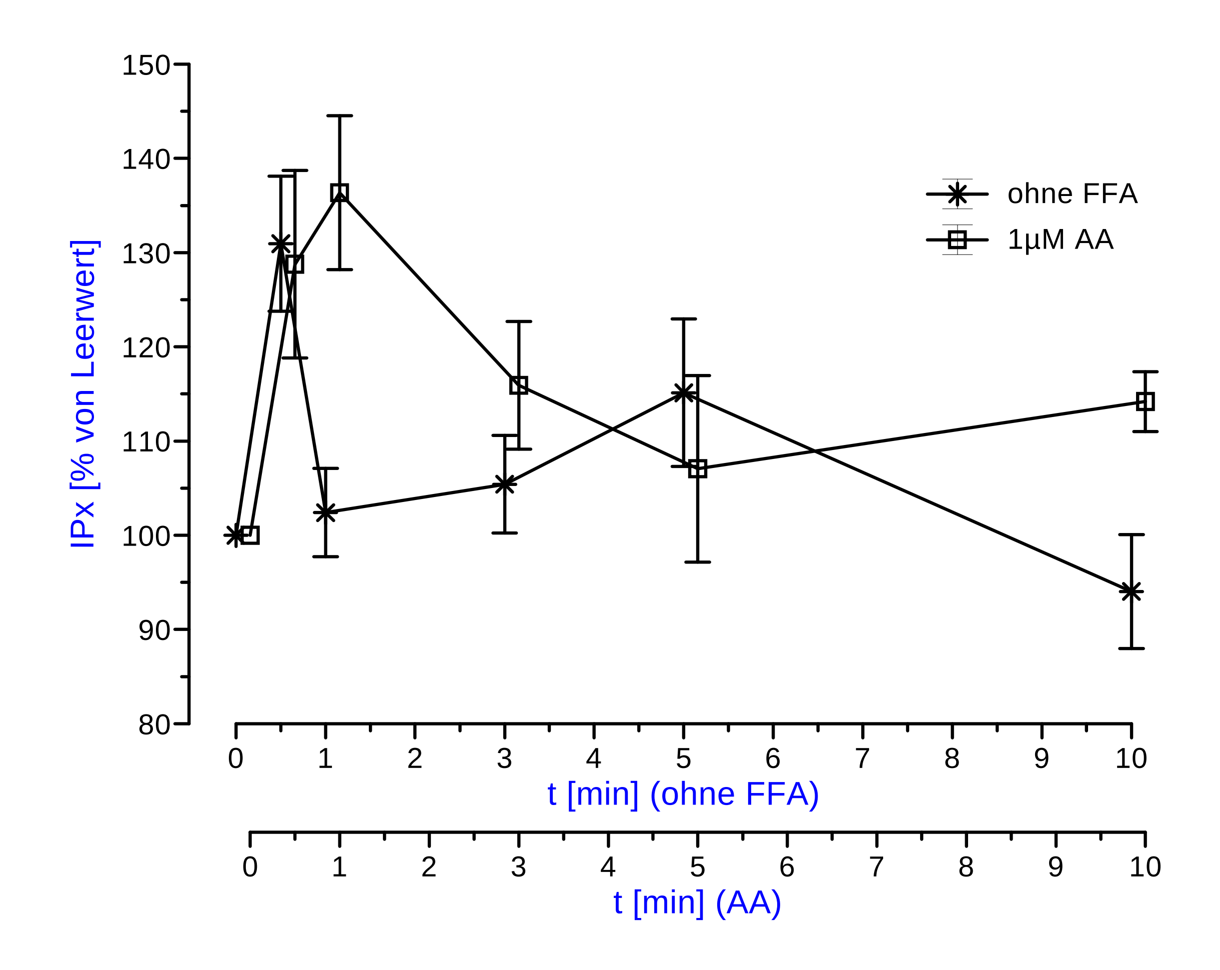


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Inositolphosphatbildung von PMN nach vorheriger Inkubation der EC mit 1 µmol/l freier Arachidonsäure bzw. ohne Inkubation mit freier Fettsäure. Stimulation mit 10 µmol/l FMLP. Alle Daten ± SEM, n=3 für AA, n=6 ohne FFA. Getrennte x-Achsen zur besseren Übersicht.

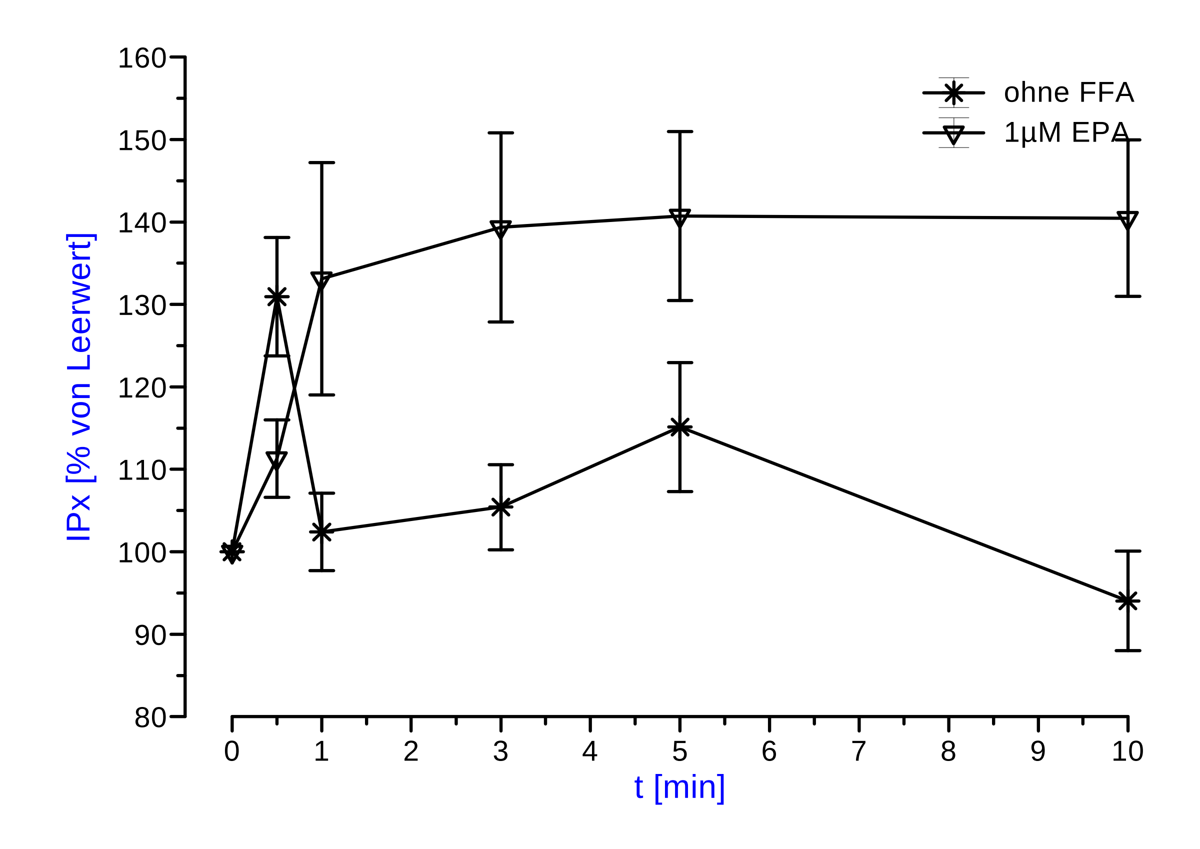


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der Inositolphosphatbildung von PMN nach vorheriger Inkubation der EC mit 1 µmol/l freier Eicosapentaensäure bzw. ohne Inkubation mit freier Fettsäure. Stimulation mit 10 µmol/l FMLP. Alle Daten ± SEM, n=5 für EPA, n=6 ohne FFA.

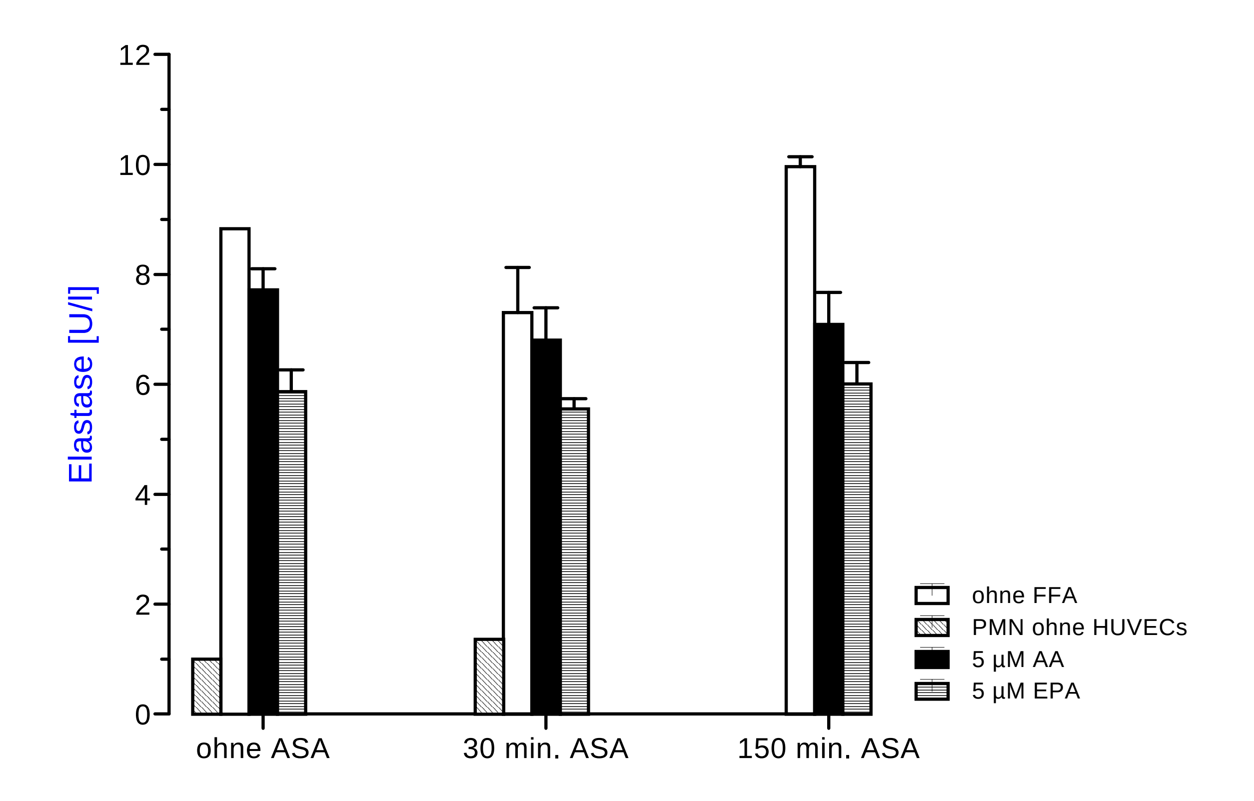


Abbildung 12: Auswirkung der Cyclooxygenaseinhibition mit Acetylsalicylsäure (ASA) auf die Elastaseaktivität im Zellüberstand. Inhibition über 30 bzw. 150 Minuten. Daten ± SEM, n=3.

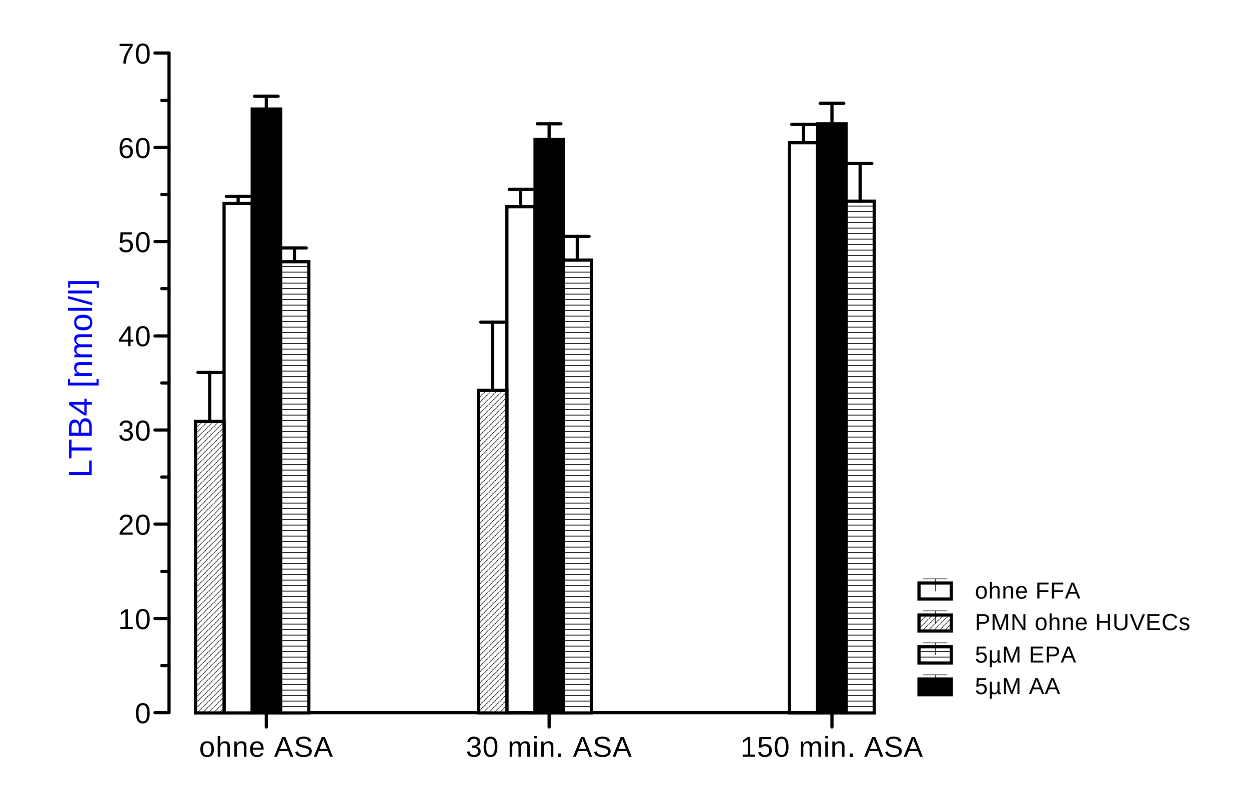


Abbildung 13: Auswirkung der Cyclooxygenaseinhibition mit Acetylsalicylsäure (ASA) auf die Ausschüttung von LTB_4 in den Zellüberstand. Inhibition über 30 bzw. 150 Minuten. Daten ± SEM, n=3.

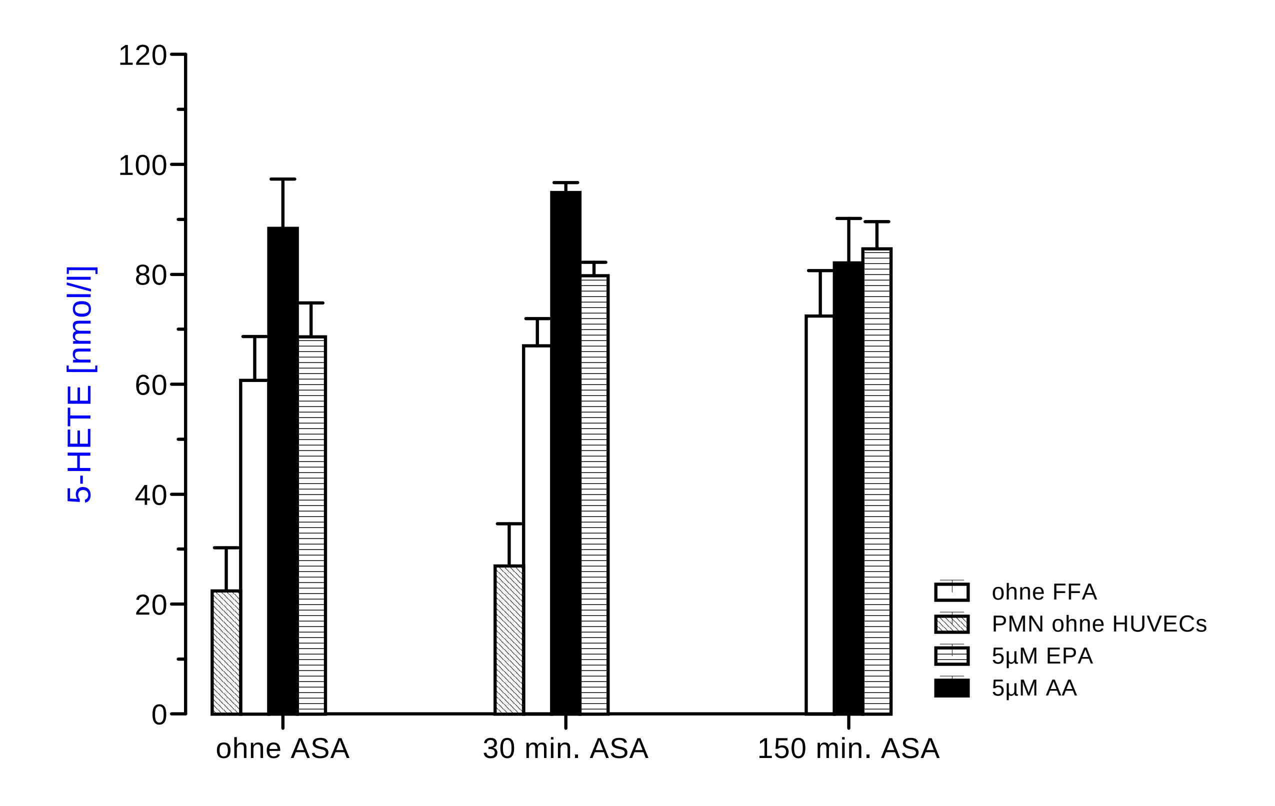


Abbildung 14: Auswirkung der Cyclooxygenaseinhibition mit Acetylsalicylsäure (ASA) auf die Ausschüttung von 5-HETE in den Zellüberstand. Inhibition über 30 bzw. 150 Minuten. Daten ± SEM, n=3.

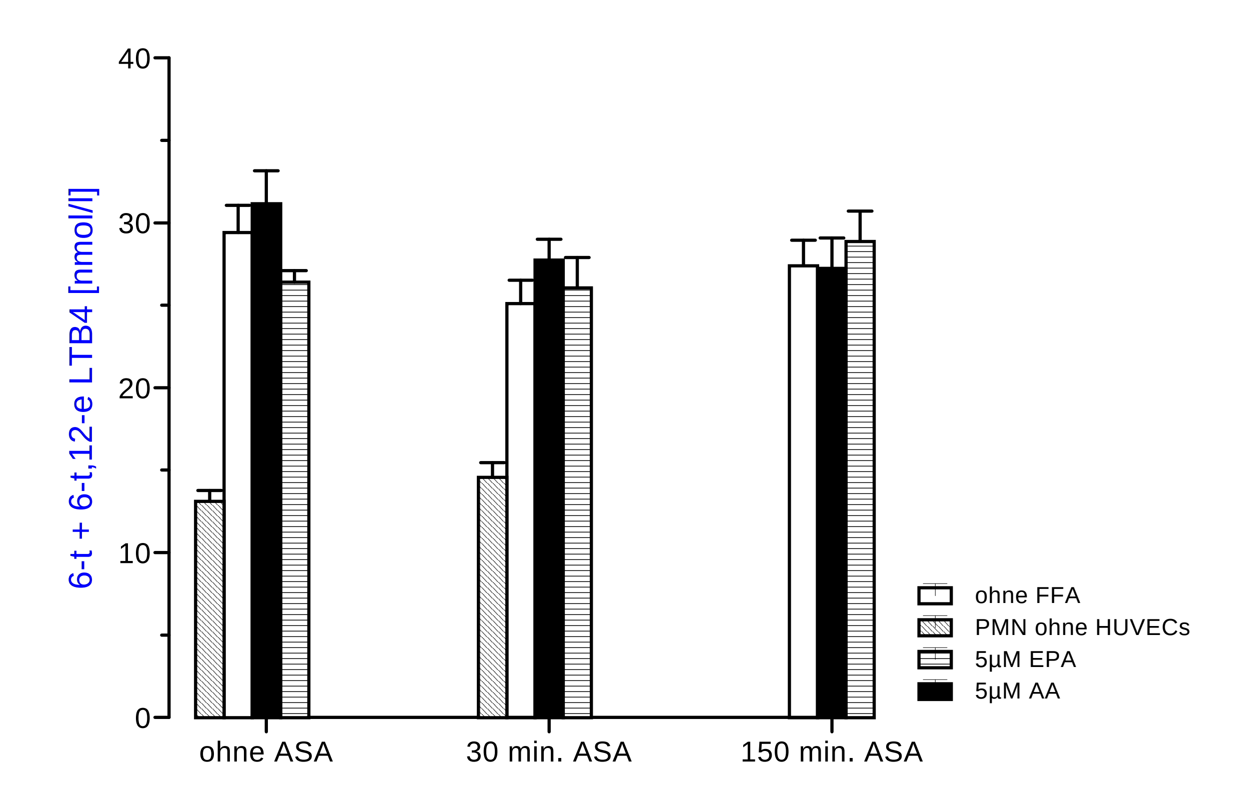


Abbildung 15: Auswirkung der Cyclooxygenaseinhibition mit Acetylsalicylsäure (ASA) auf die Ausschüttung von LTA_4-Zerfallsprodukten (6-trans- und 6-trans,12-epi-LTB_4) in den Zellüberstand. Inhibition über 30 bzw. 150 Minuten. Daten ± SEM, n=3.

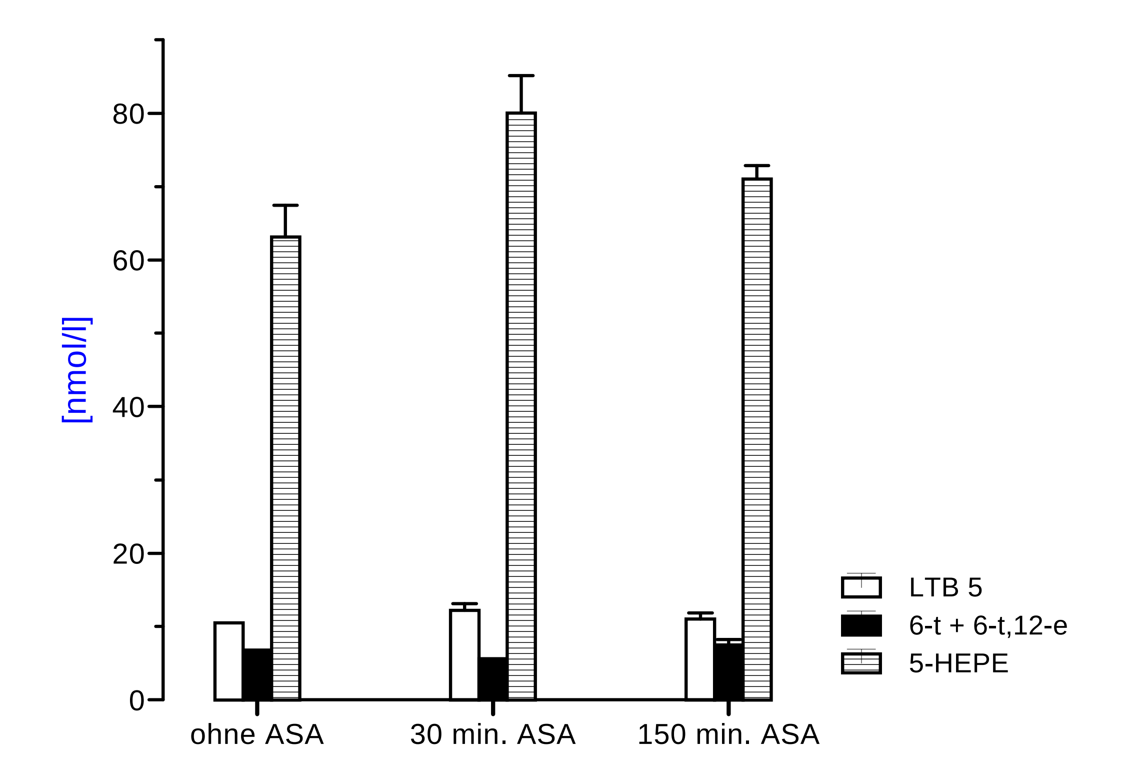


Abbildung 16: Auswirkung der Cyclooxygenaseinhibition mit Acetylsalicylsäure (ASA) auf die Ausschüttung EPA-abgeleiteter Produkte der 5-Lipoxygenase in den Zellüberstand. Inhibition über 30 bzw. 150 Minuten. Daten ± SEM, n=3.

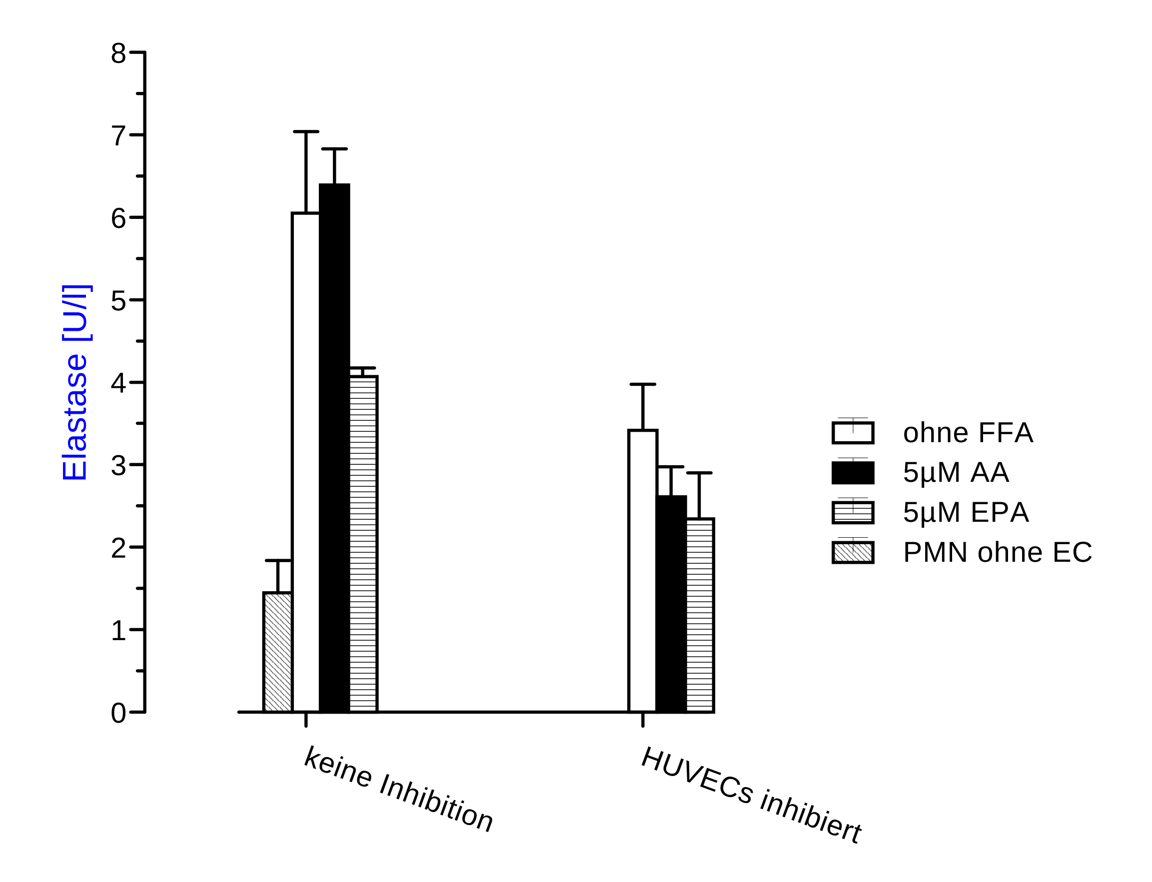


Abbildung 17: Auswirkung der Phospholipase A_2-Inhibition der EC auf die Elastaseaktivität im Zellüberstand. Daten ± SEM, n=3.

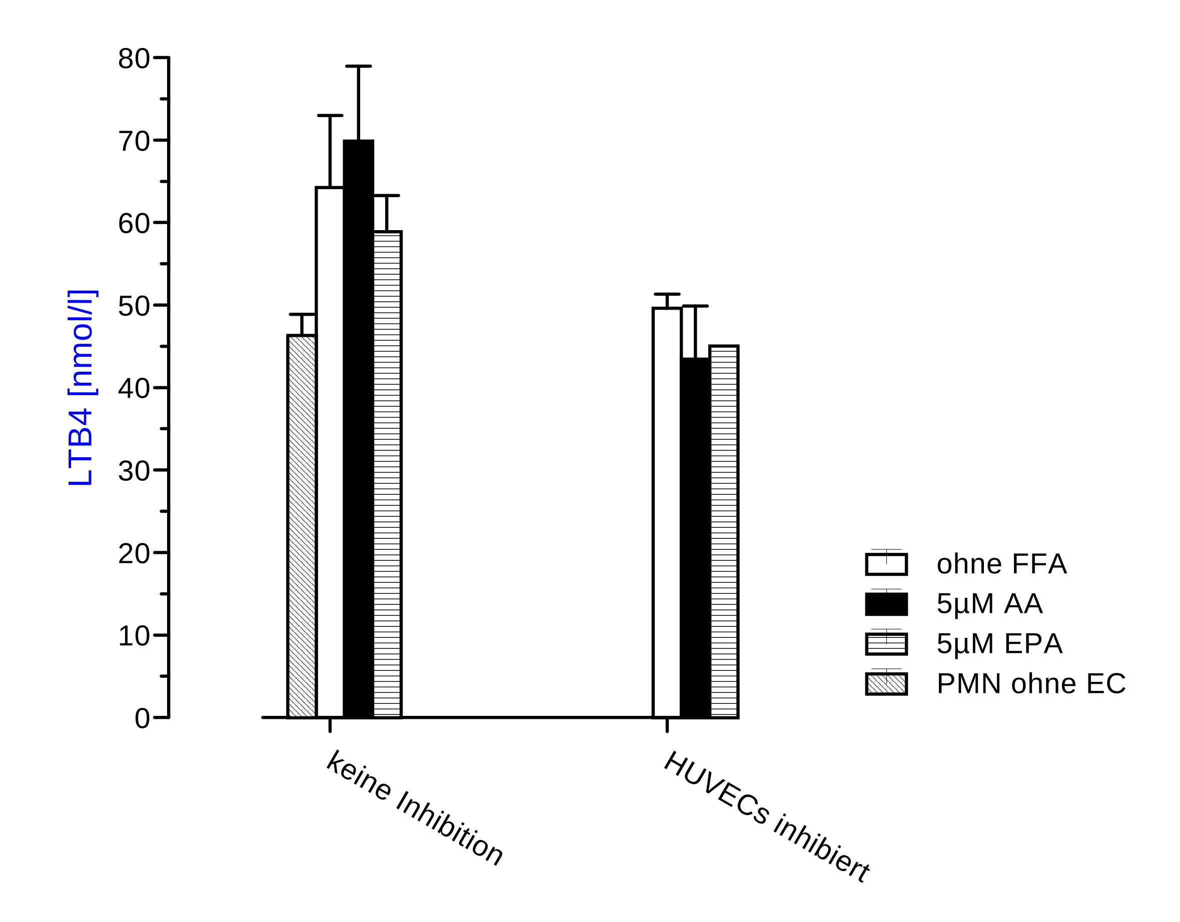


Abbildung 18: Auswirkung der Phospholipase A_2-Inhibition der EC auf die Ausschüttung von LTB_4 in den Zellüberstand. Daten ± SEM, n=3.

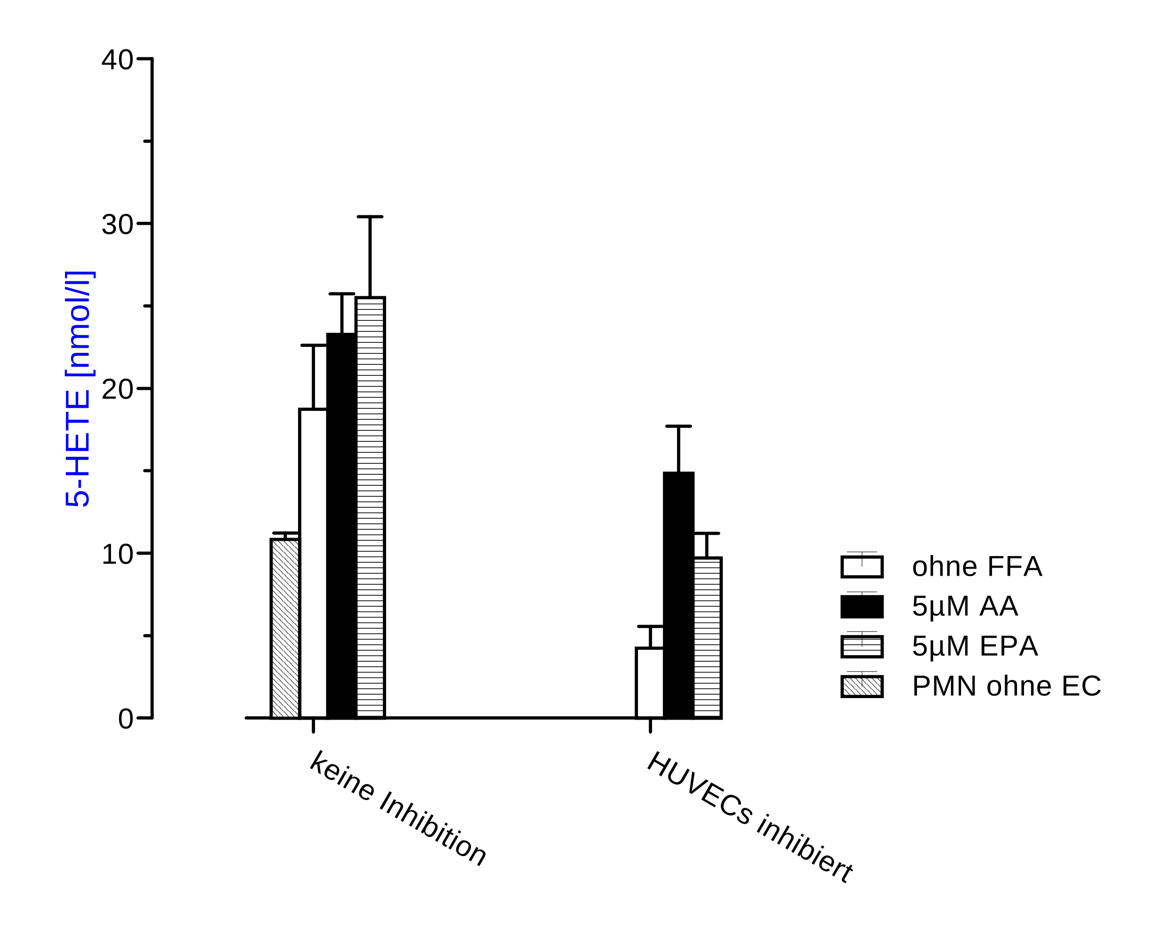


Abbildung 19: Auswirkung der Phospholipase A_2-Inhibition der EC auf die Ausschüttung von 5-HETE in den Zellüberstand. Daten ± SEM, n=3.

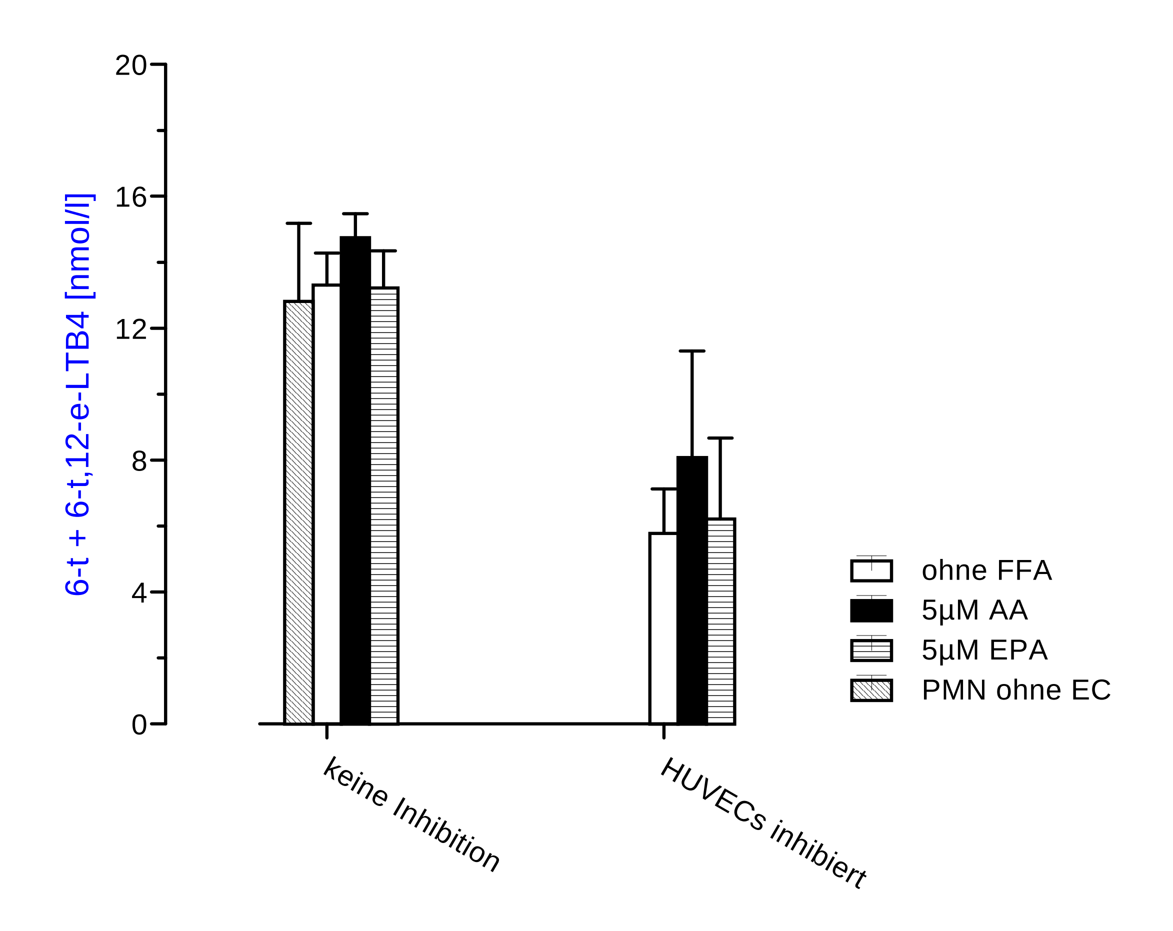


Abbildung 20: Auswirkung der Phospholipase A_2-Inhibition der EC auf die Ausschüttung von LTA_4-Zerfallsprodukten (6-trans- und 6-trans, 12-epi-LTB_4) in den Zellüberstand. Daten ± SEM, n=3.

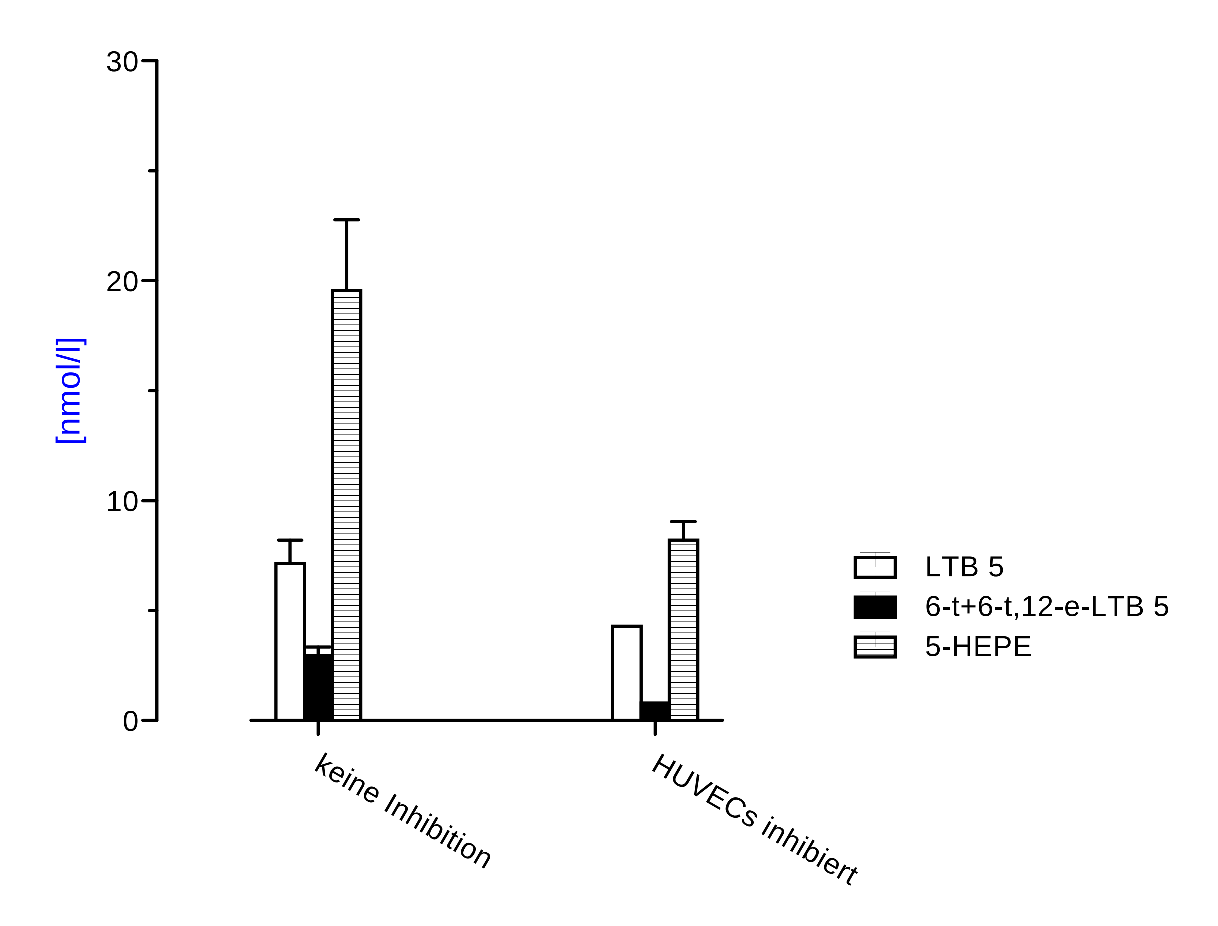


Abbildung 21: Auswirkung der Phospholipase A_2-Inhibition der EC auf die Ausschüttung von EPA-abgeleiteten Produkten der 5-Lipoxygenase in den Zellüberstand. Daten ± SEM, n=3.

4. Diskussion

4.1. Modulation der Immunantwort von PMN durch Eicosapentaensäure

4.1.1. Verminderung der Degranulationsreaktion

Die Freisetzung verschiedener proteolytischer Enzyme und Sauerstoffradikale aus cytoplasmatischen Granula von PMN spielt eine wichtige Rolle in der gezielten Abwehrreaktion des Organismus, aber auch in der Entstehung überschießender Abwehrreaktionen, die den Organismus selbst schädigen. Eine zentrale Rolle nimmt in diesem Zusammenhang die Elastase ein (3, 51, 52). In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Vorinkubation von Endothelzellen mit Eicosapentaensäure die Degranulationsreaktion von PMN reduziert, während die vorherige Inkubation mit Arachidonsäure sie erhöht. Diese Beobachtung stimmt überein mit anderen Untersuchungen: Bates et al. beschreiben eine verminderte Schädigung von Endothelzell-Monolayern durch PMN, die mit EPA vorbehandelt wurden gegenüber solchen, die mit AA gefüttert wurden (53). Dieser Effekt ist durch spezifische Elastaseinhibitoren antagonisierbar, also auf eine verminderte Degranulation von Elastase zurückzuführen.

Die Ursache der verminderten Degranulation wurde bisher nicht ermittelt. Denkbar ist jedoch, daß durch die verminderte Bildung von LTB_4 und die damit herabgesetzte autokrine Stimulation des PMN auch die Degranulationsreaktion herabgesetzt wird. Auch die Modulation der Signaltransduktion in der Zelle durch EPA könnte eine Rolle spielen (s.unten).

4.1.2. Verändertes Profil der Lipoxygenasemetabolite

Die Bildung von LTB_4 und 5-HETE durch PMN unter Koinkubation mit Endothelzellen wird durch die vorherige Inkubation der Endothelzellen mit EPA signifikant gesenkt gegenüber PMN, die mit AA-vorinkubierten Endothelzellen koinkubiert werden. Dabei ist hervorzuheben, daß Koinkubation und Stimulation ohne Anwesenheit freier Fettsäuren stattfanden; sämtliche Effekte sind also auf eine Aufnahme der Fettsäuren in die EC innerhalb der 2 Stunden Inkubationszeit zurückzuführen. Zwar konnte bisher in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden, daß freie EPA die Bildung von LTB_4 durch PMN herabsetzt und die Bildung von LTB_5 bewirkt, dies jedoch entweder bei direkter Zugabe von freier Fettsäure zu isolierten PMN (26, 34) oder nach längerfristiger oraler Einnahme von EPA-Präparaten durch die Probanden (24, 38).

Die Tatsache, daß die Menge an nichtenzymatischen Zerfallsprodukten des LTA_4 bei AA- und EPA-Versuchsreihen etwa gleich war zeigt, daß in beiden Fällen LTA_4 effektiv metabolisiert wird, und beispielsweise die geringere LTB_4-Produktion in EPA-Versuchen nicht auf einen vermehrten spontanen Zerfall des LTA_4 zurückzuführen ist.

Das Auftreten von Lipoxygenaseprodukten der 5er-Reihe ist darüber hinaus ein weiterer Beweis für die kooperative Eicosanoidsynthese von PMN und EC (18, 19): Das zur Bildung von LTB_5 und 5-HEPE notwendige Substrat EPA kann den PMN nur von den EC zugeführt worden sein. EC allein wiederum besitzen nicht die notwendige Enzymausstattung, um LTB_5 oder 5-HEPE zu synthetisieren.

Es kann also gefolgert werden, daß EC sowohl freie AA als auch freie EPA innerhalb von wenigen Stunden aufnehmen und auf einen Stimulus hin den PMN wieder zur Verfügung stellen können. Angesichts der kurzen Inkubationszeit und der relativ niedrigen Konzentration der Fettsäuren könnte sogar vermutet werden, daß EPA bevorzugt gegenüber AA von den EC wieder freigegeben bzw. von den PMN metabolisiert wird, da die Gesamtmenge der von vornherein in

der Zellmembran gespeicherten AA die Menge der im Versuch zugeführten EPA bzw. AA ja weit übersteigt. Dies würde die Beobachtung unterstützen, daß EPA gegenüber AA das bevorzugte Substrat der Lipoxygenase ist (26).

4.1.3. Herabgesetzte Adhärenz von PMN an Endothelzellen

PMN und Endothelzellen treten über Adhäsionsmoleküle miteinander in Kontakt. Dieser Vorgang kann als erster Schritt in der weiteren Abfolge der Abwehrreaktion wie auch überschießender inflammatorischer Prozesse angesehen werden. Eine Blockade der Adhäsionsmoleküle auf EC verhindert die Rekrutierung von PMN und damit die folgende entzündliche Reaktion (54). Die enge Kooperation von PMN und EC ist gleichzeitig die Quelle erhöhter Leukotrienproduktion (55, 56). In den von uns durchgeführten Versuchen konnte eine signifikante Abnahme der Adhärenz stimulierter PMN an solchen EC beobachtet werden, die mit EPA vorinkubiert worden waren - dies sowohl gegenüber Versuchen mit AA-Vorinkubation, als auch gegenüber Versuchen ohne Zufuhr freier Fettsäuren. Dieses Ergebnis läßt sich in Einklang bringen mit Untersuchungen von Collie-Duguid (57), Weber (58), De Caterina (59) und Hoover (60). Collie-Duguid, Weber und De Caterina fanden eine erniedrigte Expression von VCAM-1-Adhäsionsmolekülen auf stimulierten EC nach Behandlung mit EPA oder DHA. Hoover et al. berichten von erhöhter Adhärenz von PMN auf EC durch Behandlung der EC mit LTB_4. Zum einen scheint also die verminderte Produktion von LTB_4 durch PMN, bzw. die alternative Synthese von LTB_5 eine Rolle bei der reduzierten Adhärenz an EC in den vorliegenden Versuchen zu spielen. Zum anderen könnte eine herabgesetzte Expression von Adhäsionsmolekülen durch die Fütterung mit EPA einen Erklärungsansatz liefern. Im Widerspruch dazu steht eine Arbeit von Bates et al. (61), in der eine Steigerung der Adhärenz von PMN durch Fütterung sowohl mit AA als auch mit EPA oder DHA beobachtet wurde. Jedoch wurden dort Versuche

nur mit PMN ohne EC durchgeführt, die erhöhte Adhärenz wurde an Kunststoffwells gemessen und auf eine erhöhte Expression von CD11b-Rezeptoren auf den PMN zurückgeführt. Entscheidend für die effektive Vermittlung der Adhärenz von PMN und EC ist jedoch das Vorhandensein korrespondierender Adhäsionsmoleküle auf beiden Zelltypen. Bei unseren Versuchen wurden außerdem ausschließlich die EC differentiell mit freien Fettsäuren gefüttert, nicht aber die PMN.

Ein weiterer Aspekt in der Frage der verminderten Adhärenz von PMN an EC ist die Rolle von PAF. PAF ist ein Lipidmediator mit vielfältigen biologischen Wirkungen. Unter anderem kann er als Vermittler der Adhäsion von PMN und EC angesehen werden: Zimmerman et al. belegen, daß erst durch die Koexpression von Selectin und PAF auf der Zelloberfläche von EC nach Stimulation der Übergang vom Rollen der PMN zu einer festen Adhäsion und folgender Transmigration der PMN zustandekommt (62, 63). In bisher unveröffentlichten Untersuchungen von Mayer et al. konnte gezeigt werden, daß EC-Monolayer, die mit EPA inkubiert wurden, weniger PAF exprimieren als solche, die mit AA inkubiert wurden. Eine mögliche Ursache dafür wäre die Metabolisierung von PAF: PAF unterliegt einem schnellen Ab- und Aufbau durch eine Deacylierung bzw. Reacylierung, bei der AA an der sn2-Position des Phospholipids eingebaut wird. In Versuchen mit PMN, denen EPA zugeführt worden war, wurde statt AA teilweise EPA in den PAF-Precursor eingebaut (64). Dieser Einbau von EPA erscheint auch für in EC vorhandenen PAF-Precursor möglich. Auf diesem Weg könnte die Funktion von PAF moduliert und in der Folge seine Exprimation auf der Zelloberfläche herabgesetzt werden.

Neben der Vermittlung der Adhärenz ist PAF auch ein potenter Stimulus für Chemotaxis und Degranulation von PMN (65). Eine durch EPA modulierte Funktion von PAF könnte also auch bei der oben beschriebenen reduzierten Degranulationsreaktion der PMN eine Rolle spielen.

4.1.4. Veränderung der Signaltransduktion

Auf eine Modulation der Signaltransduktion in PMN deuten die Ergebnisse bezüglich der Bildung von Inositolphosphaten (IP) hin. Der Weg der Signalübermittlung über Inositolphosphate wird von vielen Hormonen, Neurotransmittern, Wachstumsfaktoren u.ä. genutzt. Diese aktivieren Phospholipase C, die Phosphatidylinositolbisphosphat zu -trisphosphat hydrolysiert, welches wiederum einen Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle bewirkt und damit zahlreiche Effektormechanismen in Gang setzt (66, 67). Zu den Folgen gehören im Falle von PMN u.a. Degranulation, respiratorische Burstreaktion und Lipidmediatorproduktion. In vorliegenden Versuchen zeigt die IP-Bildung in PMN, die mit EPA-gefütterten EC inkubiert wurden, einen deutlich verzögerten Anstieg. Die Verzögerung liegt im Bereich mehrerer Minuten, und der charakteristische frühe Peak der IP-Bildung ist nicht mehr zu erkennen.

Sperling et al. zeigten einen ähnlichen Effekt bei PMN von Spendern, die 3-10 Wochen lang eine EPA-reiche Diät bekommen hatten (38). Dort wurde die Bildung von Inositolphosphaten bereits nach 15 Sekunden gestoppt. Ergebnis war eine deutlich geringere Produktion von IP_3 in solchen PMN, die unter dem Einfluß der EPA-Diät gestanden hatten. Dies bestätigt unsere Ergebnisse, die ebenfalls eine deutlich geringere IP-Menge zu einem frühen Zeitpunkt nach Stimulation in der EPA-Gruppe zeigen. Sperling führt diese Änderung u.a. auf eine sterische Inhibition der spezifischen Phospholipase C durch EPA zurück.

Daß die Signaltransduktion der PMN moduliert wird, wenn sie mit EC koinkubiert werden, die vorher mit EPA inkubiert waren, könnte zum einen an der - oben beschriebenen - veränderten Exprimation von PAF an der EC-Zelloberfläche liegen, mit konsekutiver Veränderung der Adhärenzzustände der PMN und veränderter Interaktion der Zellen. Zum anderen könnte die verminderte LTB_4-Synthese und die vermehrte Bildung von EPA-abgeleiteten Metaboliten die autokrine Stimulation (autokriner loop) der PMN beeinflussen: Sowohl PAF als

auch LTB_4 können die Second-Messenger-Reaktion (und damit die Inositolphosphatbildung) auslösen bzw. verstärken, was wiederum zu vermehrter LTB_4-Produktion durch PMN führt und die Second-Messenger-Produktion erhöht usw. Eine geringere PAF- bzw. LTB_4-Produktion könnte also auch die Bildung von Second-Messenger-Produkten modulieren.

Ein weiteres Feld der Signaltransduktion, auf dem die antiinflammatorische Wirksamkeit der Eicosapentaensäure ihren Ursprung haben könnte, ist der direkte Angriff am Zellkern: Neuere Untersuchungen zeigen, daß freie Fettsäuren an den Peroxisomen Proliferations-Aktivator Rezeptor α (PPARα) des Zellkerns binden können, der die Expression von u.a. für den Lipidmetabolismus wichtigen Genen steuert (68, 69, 70). Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, um zu erforschen, ob EPA auch auf diesem Level einen Einfluß auf die Signaltransduktion hat.

4.2. Bedeutung der Cyclooxygenase und Phospholipase A_2 für die immunmodulierende Wirkung von EPA am Inkubationsmodell

4.2.1. Bedeutung der Cyclooxygenase

In den durchgeführten Versuchen hatte die Inhibition der Cyclooxygenase von PMN und EC keinen signifikanten Einfluß auf die Bildung von Lipoxygenaseprodukten und Elastase. Durch die Hemmung der Cyclooxygenase wird der zweite wichtige Abbauweg der AA (neben dem Lipoxygenaseweg) gehemmt. Produkte der Cyclooxygenase sind die Thromboxane und Prostaglandine, die ihrerseits teils proinflammatorische, teils antiinflammatorische Wirkung besitzen. Ziel der Inhibition war es, mögliche Einflüsse der Cyclooxygenaseprodukte im Hinblick auf die antiinflammatorische Wirkung der EPA herauszufiltern und die alleinige Auswirkung der

Lipoxygenaseprodukte beurteilen zu können. In früheren Untersuchungen am Tiermodell konnte gezeigt werden, daß eine Inhibition der Cyclooxygenase die Wirkung der EPA teilweise aufheben konnte, so z.B. die herabgesetzte Vasokonstriktion in der pulmonalen Strombahn nach Stimulation (32). Auch wurden - ebenfalls am Tiermodell - höhere Mengen an Leukotrienen gefunden, was auf eine höhere Menge an verfügbarem Substrat für die Lipoxygenase zurückgeführt wurde. Ein solcher Effekt trat in den hier beschriebenen Versuchen nicht auf. Auch Bates et al. (53) fanden in ihren Versuchen mit koinkubierten PMN und EC, in denen allerdings die PMN mit freier Fettsäure behandelt wurden, keinen Effekt einer Cyclooxygenasehemmung in Bezug auf die Elastasefreisetzung. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Tatsache, daß zwar einerseits die verfügbare Substratmenge für die Lipoxygenase unter Cyclooxygenasehemmung erhöht ist, andererseits aber auch die zusätzliche Stimulation durch Prostaglandine fehlt, so daß beide Effekte sich nivellieren. Jedenfalls scheint die An- oder Abwesenheit der Cyclooxygenaseprodukte keinen entscheidenden Einfluß auf die antiinflammatorische Wirkung von EPA gegenüber AA am vorliegenden Modell zu haben.

4.2.2. Bedeutung der Phospholipase A_2

Phospholipasen spalten Fettsäuren aus den Phospholipidpools der Zellmembranen ab und sorgen somit für das Substrat “freie Fettsäure”, das Lipoxygenasen zur Bildung von Leukotrienen benötigen (71, 72). Eine Hemmung der Phospholipase A_2 der EC müsste also zu einer verminderten Bildung von Leukotrienen durch die PMN führen, wenn diese wirklich von den EC mit Arachidonsäure bzw. Eicosapentaensäure versorgt werden (kooperative Eicosanoidsynthese). Dies wäre gleichzeitig ein Zeichen dafür, daß die in den Versuchen gefütterten freien Fettsäuren wirklich in die Phospholipidpools der EC eingebaut wurden und somit der kontrollierten Freisetzung durch Phospholipasen unterlagen.

Dieser Effekt konnte in den durchgeführten Versuchen gezeigt werden: Unter Inhibition der Phospholipase A_2 der EC sank die Bildung von Leukotrienen sowohl der 4er- als auch der 5er-Reihe deutlich ab. Gleichzeitig verschwand der Elastase- und LTB_4-supprimierende Effekt der EPA-Zufuhr. Daraus kann zunächst geschlossen werden, daß freie AA und EPA bereits nach 2stündiger Inkubation in den Phospholipidpools der EC gespeichert werden, denn offensichtlich ist Phospholipase A_2 erforderlich, um die vorher gezeigten Effekte hervorzurufen. Außerdem kann aus den vorliegenden Ergebnissen auf eine zentrale Rolle der 5er-Reihe der Leukotriene als Vermittler der antiinflammatorischen Wirkung von EPA geschlossen werden: Bei Reduktion der 5er-Produkte läßt sich auch kein antiinflammatorischer Effekt mehr zeigen. Darüber hinaus bestätigt dieses Ergebnis die kooperative Eicosanoidsynthese von PMN und EC, denn es entstehen deutlich weniger Lipoxygenaseprodukte, wenn selektiv die Phospholipase der EC inhibiert wird, d.h. diese den PMN kein Substrat mehr liefern können.

5. Zusammenfassung

Die Interaktion von Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen spielt eine zentrale Rolle in der Enstehung inflammatorischer Erkrankungen der Lunge. Ausgehend von der Notwendigkeit parenteraler Zufuhr von Lipiden bei schwerstkranken Patienten und dem Wissen um die proinflammatorischen Wirkungen der darin enthaltenen Arachidonsäure sollte in der vorliegenden Arbeit der Wirkung einer alternativen Fettsäure, der aus Fischölen gewonnenen ω-3-Fettsäure Eicosapentaensäure, nachgegangen werden. Fischöle stehen inzwischen zur alternativen parenteralen Zufuhr zur Verfügung. Daher sollte geprüft werden, ob Endothelzellen angebotene freie Fettsäuren innerhalb kurzer Zeit aufnehmen, und ob sich die Fettsäurezufuhr auf eine spätere Koinkubation mit Granulozyten im Hinblick auf deren Immunantwort auswirkt. Des weiteren wurden Ansätze untersucht, die eine Erklärung für die Modulation der Immunantwort liefern könnten.

Als Parameter zur Erfassung der Immunantwort der Granulozyten dienten Leukotriene als Lipidmediatoren, Elastase als proteolytisches Enzym bei Degranulationsreaktionen, sowie die Adhärenz von PMN an EC und die Bildung von Second-Messenger-Produkten durch PMN. Die Zellen wurden in vitro isoliert, koinkubiert und mit dem Calcium-Ionophor A 23187 bzw. mit FMLP stimuliert.

Sowohl bei der Elastase- als auch bei der Leukotrienproduktion der Granulozyten konnte die antiinflammatorische Wirkung der EPA gezeigt werden. Zusammen mit dem Auftreten der von EPA abgeleiteten von den Granulozyten produzierten Lipidmediatoren zeigt dies die effektive Aufnahme der EPA durch die Endothelzellen und deren Bereitstellung bei darauffolgender Stimulation. Dies konnte noch erhärtet werden durch die Hemmung der Phospholipase A_2 der Endothelzellen, die den positiven Effekt der EPA teilweise wieder aufhob. Demgegenüber

blieb eine Inhibition der Cyclooxygenase weitgehend ohne Effekt.

Des weiteren konnte die Herabsetzung der Adhärenz von PMN an EPA-gefütterten Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Messung der Second-Messenger-Bildung anhand der Inositolphosphatproduktion sollte den Einfluß von EPA auf die Signaltransduktion in der Zelle klären. Hier zeigte sich eine Modulation der Signalantwort von PMN im Sinne einer verzögerten Bildung von Inositolphosphaten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die parenterale Zufuhr von Lipidemulsionen auf Basis von ω-3-Fettsäuren eine hemmende Wirkung auf inflammatorische Prozesse im Organismus haben kann, da EPA von Endothelzellen innerhalb kurzer Zeit gespeichert wird und hierüber die Immunantwort von endotheladhärenten PMN beeinflußt.

6. Literaturverzeichnis

1 Brigham, K. L., Meyrick, B.: Interactions of granulocytes with the lungs. *Circ. Res.* 54: 623-635, 1984

2 Grimminger, F., Walmrath, H. D., Seeger, W. and Lasch, H. G.: Granulozyten-Endothel-Interaktion. *Hämostaseologie* 14: 7-15, 1994

3 Westlin, W. F. and Gimbrone M. A.: Neutrophil damage to human vascular endothelium. Role of cytokine activation. *Am. J. Path.* 142:117-128, 1993

4 Holtzman, M. J.: Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143: 188-203, 1991

5 Peterson, J., Bihain, B. E., and Olivecrona, T.: Fatty acid control of lipoprotein lipase: A link between energy metabolism and lipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 909-913, 1990

6 Stenson, W. R., and Parker, C. W.: Metabolism of arachidonic acid in ionophore stimulated neutrophils. Esterification of a hydroxylated metabolite into phospholipids. *J. Clin. Invest*. 64: 1457-1465, 1979

7 Siegel, M. I., McConnell, R. T., Bonser, R. W., and Cuatrecasas, P.: The lipoxygenase product 5-hydroperoxy-arachidonic acid augments chemotactic peptide-stimulated arachidonic acid release from HL60 Granulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 104: 874-881, 1982

8 Vanderhoek, J. Y., Bryant, R. W., Bailey, J. M.: Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-HETE. *J. Biol. Chem.* 255: 10064-10065, 1980

9 Moncada, S., Higgs, E. A.: Arachidonate metabolism in blood cells and the vessel wall. *Clin. Haematol.* 15: 273-292, 1986

10 Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., and Lefkowith, J. B.: Arachidonic acid metabolism. *Ann. Rev. Biochem*. 55: 69-102, 1986

11 Borgeat, P.: Biochemistry of the lipoxygenase pathways in neutrophils. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67: 936-942, 1989

12 Rouzer, C. A., and Kargman, S.: Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J. Biol. Chem*. 263: 10980-10988, 1988

13 Grimminger, F., Sibelius, U., and Seeger, W.: Amplification of LTB_4 generation in AM-PMN cocultures: transcellular 5-lipoxygenase metabolism. *Am. J. Physiol.* 261:L195-L203, 1991

14 Brigham, K. L., Meyrick, B.: Endotoxin and lung injury. *Am Rev. Respir. Dis.* 133: 913-27, 1986

15 Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J.: Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 107: 147-223, 1987

16 Walmrath, D., Grimminger, F., Seeger, W.: Sepsis und ARDS. Mögliche Rolle bakterieller Endotoxine. *Med. Welt* 44: 23, 1993

17 Brady, H. R., Lamas, S., Papayianni, A., Takata, S., Matsubara, M., and Marsden, P. A.: Lipoxygenase product formation and cell adhesion during neutrophil-glomerular endothelial cell interaction. *Am. J. Physiol.* 268: F1-F12, 1995

18 Grimminger, F., Kreusler, B., Schneider, U., Becker, G., and Seeger, W.: Influence of microvascular adherence on neutrophil leukotriene generation. Evidence for cooperative eicosanoid synthesis. *J. Immunol.* 144: 1866-1872, 1990

19 Feinmark, S. J.: The role of the endothelial cell in leukotriene biosynthesis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146: S51-S55, 1992

20 Claesson, H.-E., and Haeggström, J.: Human endothelial cells stimulate leukotriene synthesis and convert granulocyte released leukotriene LTA_4 into leukotriene B_4, C_4, D_4 and E_4. *Eur. J. Biochem.* 173: 93-100, 1988

21 Grimminger, F., Kreusler, B., Schneider, U., Becker, G., and Seeger, W.: Influence of microvascular adherence on neutrophil leukotriene generation. Evidence for cooperative eicosanoid synthesis. *J. Immunol.* 144: 1866-1872, 1990

22 Kromann, N., Green, A.: Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. *Acta Med. Scand.* 208: 401-406, 1980

23 Dyerberg, J. and Bang, H. O.: Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet* 2: 117, 1978

24 Terano, T., Salmon, J. A., Higgs, G. A., and Moncada, S.: Eicosapentaenoic acid as a modulator of inflammation. Effect on prostaglandin and Leukotriene Synthesis. *Biochem. Pharmacol.* 35: 779-785, 1986

25 Lee, T. H., Mencia-Huerta, J.-M., Shih, C., Corey, E. J., Lewis, R. A., and Austen, K. F.: Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B_5 and the double lipoxygenase product. *J. Biol. Chem.* 259: 2383-2389, 1984

26 Grimminger, F., Dürr, U., and Seeger, W.: Ligand-operated synthesis of 4-series and 5-series leukotrienes in human neutrophils: critical dependence on exogenous free fatty acid supply. *Mol. Pharmacol.* 41: 757-766, 1992

27 Belluzzi, A., Brignola, C., Campieri, M., Pera, A., Boschi, S., and Miglioli, M.: Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 334: 1557-1560, 1996

28 Kremer, J. M.: Effects of modulation of inflammatory and immune parameters in patients with rheumatic and inflammatory disease receiving dietary supplementation of n-3 and n-6 fatty acids. *Lipids* 31: 243-247, 1996

29 Grimminger, F. and Mayser, P.: Lipid mediators, free fatty acids and psoriasis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 52: 1-15, 1995

30 Bennett, W. M., Carpenter, C. B., Shapiro, M. E., Strom, T. B., Hefty, D., Tillman, M., Abrams, J., Ryan, D., and Kelley, V. R.: Delayed omega-3 fatty acid supplements in renal transplantation. *Transplantation* 59: 352-356, 1995

31 Bower, R. H., Cerra, F. B. et al.: Early enteral administration of a formula (Impact®) supplemented with arginine, nucleotides, and fish oil in intensive care unit patients: Results of a multicenter, prospective, randomized, clinical trial. *Crit. Care Med.* 23: 436-449, 1995

32 Grimminger, F., Mayer, K., Krämer, H.-J., Stevens, J., Walmrath, D., and Seeger, W.: Differential vasoconstrictor potencies of free fatty acids in the lung vasculature: 2- versus 3-series prostanoid generation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267: 259-265, 1993

33 Grimminger, F., Wahn, H., Krämer, H.-J., Stevens, J., Mayer, K., Walmrath, D., and Seeger, W.: Differential influence of arachidonic vs. eicosapentaenoic acid on experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.* 268: H1-H7, 1995

34 Grimminger, F., Wahn, H., Mayer, K., Kiss, L., Walmrath, D., and Seeger, W.: Impact of arachidonic versus eicosapentaenoic acid on exotoxin-induced lung vascular leakage. Relation to 4-series versus 5-series leukotriene generation. *Am. J. Repir. Crit. Care Med.* 155: 513-519, 1997

35 Sanderson, P., Yaqoob, P., and Calder, P. C.: Effects of dietary lipid manipulation upon graft vs host and host vs graft responses in the rat. *Cell. Immunol.* 164:240-247, 1995

36 Ku, K., Nosaka, S., Hashimoto, M., Kin, S., Saitoh, Y., Alam, M. S., Masumura, S., and Nakayama, K.: The effects of ω-3 polyunsaturated fatty acids on the recovery of cardiac function following cold preservation and reperfusion in hyperlipidemic rats. *Transplantation* 62: 735-742, 1996

37 Caughey, G. E., Mantzioris, E., Gibson, R. A., Cleland, L. G., and James, M. J.: The effect on tumor necrosis factor α and interleukin 1β production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 116-122, 1996

38 Sperling, R. I., Austen, K. F., and Robinson, D. R.: Dietary ω-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J. Clin. Invest.* 91: 651-660, 1993

39 De Caterina, R., Gombrone, M. A., Libby, P.: The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb.* 14: 1829-1836, 1994

40 Terano, T., Shiina, T., and Tamura, Y.: Eicosapentaenoic acid suppressed the proliferation of smooth muscle cells through modulation of various steps of growth signals. *Lipids* 31: 301-304, 1996

41 Terano, T., Hirai, A., Shiina, T., Tamura, Y., and Saitoh, Y.: Mechanism of anti-proliferative action of eicosapentaenoic acid in vascular cell growth: Its effect on signal transduction system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 417: 399-404, 1997

42 Mayer, K., Seeger, W., and Grimminger, F.: Clinical use of lipids to control inflammatory disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 1: 179-184, 1998

43 Calder, P.C.: Can n-3 polyunsaturated fatty acids be used as immunomodulatory agents? *Biochem. Soc. Trans.* 24: 211-220, 1996

44 Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Invest.* 21 Suppl. 97: 77-89, 1968

45 Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R.: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* 52: 2745-2756, 1973

46 Street, I. P., Lin, H.-K., Laliberté, F. et al.: Slow- and tight-binding inhibitors of the 85-kDa Phospholipase A_2. *Biochem.* 32: 5935-5940, 1993

47 Kramps, J. A., Van Twisk, C., and Van der Linden, A. C.: L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-valine-p-nitroanilide, a highly specific substrate for granulocyte elastase. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 43: 427-432, 1983

48 Kiss, L., Bienek, E., Weissmann, N. et al.: Simultaneous analysis of 4- and 5-series lipoxygenase and cytochrome p450 products from different biological sources by reversed-phase high-performance liquid chromatographic technique. *Analyt. Biochem.* 261: 16-28, 1998

49 Danpure, H. J., Osman, S., and Brady, F.: The labelling of blood cells in plasma with $[^{111}]$In-tropolonate. *Br. J. Radiol.* 55: 247-249, 1982

50 Berridge, M. J., Dawson, R. M. C., Downes, C. P., Heslop, J. P., and Irvine, R. F.: Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phophoinositides. *Biochem. J.* 212: 473-482, 1983

51 Smedly, L. A., Tonnesen, M. G., Sandhaus, R. A., Haslett, C., Guthrie, L. A., Johnston Jr., R. B., Henson, P. M., and Worthen, G. S.: Neutrophil-mediatied injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J. Clin. Invest.* 77: 1233-1243, 1986

52 Harlan, J. M., Killen, P. D., Harker, L. A., and Striker, G. E.: Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro. Mechanisms of cell detachment. *J. Clin. Invest.* 68: 1394-1403, 1981

53 Bates, E. J., Ferrante, A., Harvey, D. P., Nandoskar, M., and Poulos, A.: Docosahexaenoic acid (22:6, n-3) but not eicosapentaenoic acid (20:5, n-3) can induce neutrophil-mediated injury of cultured endothelial cells: involvement of neutrophil elastase. *J. Leukoc. Biol.* 54: 590-598, 1993

54 Malik, A. B. and Lo, S. K.: Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharmacol. Rev.* 48: 213-229, 1996

55 Ishii, Y., Lo, S. K., and Malik, A. B.: Neutrophil adhesion to TNFα-activated endothelial cells potentiates leukotriene B_4 production. *J. Cell. Physiol.* 153: 187-195, 1992

56 Brady, H. R. and Serhan, C. N.: Adhesion promotes transcellular leukotriene biosynthesis during neutrophil-glomerular endothelial cell interactions: Inhibition by antibodies against CD18 and L-selectin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 186: 1307-1314, 1992

57 Collie-Duguid, E. S. R. and Wahle, K. W. J.: Inhibitory effect of fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 220: 969-974, 1996

58 Weber, C., Erl, W., Pietsch, A., Danesch, U., and Weber, P. C.: Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-α. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 622-628, 1995

59 De Caterina, R. and Libby, P.: Control of endothelial leucocyte adhesion molecules by fatty acids. *Lipids* 31: S57-S63, 1996

60 Hoover, R. L., Karnovsky, M. J., Austen, K. F., Corey, E. J., and Lewis, R. A.: Leukotriene B4 action on endothelium mediates augmented neutrophil/endothelial adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2191-2193, 1984

61 Bates, E. J., Ferrante, A., Harvey, D. P., and Poulos, A.: Polyunsaturated fatty acids increase neutrophil adherence and integrin receptor expression. *J. Leukoc. Biol.* 53: 420-426, 1993

62 Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Mehra, M., and Prescott, S. M.: Endothelial cell-associated platelet-activating factor: A novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J. Cell Biol.* 110: 529-540, 1990

63 Zimmerman, G. A., Elstad, M. R., Lorant, D. E. et al.: Platelet-activating factor (PAF): Signaling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 416: 297-304, 1996

64 Chabot, M. C., Schmitt, J. D., Bullock, B. C., and Wykle, R. L.: Reacylation of platelet activating factor with eicosapentaenoic acid in fish-oil-enriched monkey neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 922: 214-220, 1987

65 Imaizumi, T.-A., Stafforini, D. M., Yamada, Y., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., and Zimmerman, G. A.: Platelet-activating factor: A mediator for clinicians. *J. Int. Med.* 238: 5-20, 1995

66 Exton, J. H.: Regulation of phophoinositide phospholipases by G-proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 417: 3-8, 1997

67 Exton, J. H.: Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1212: 26-42, 1994

68 Kliewer, A. S., Sundseth, S. S., Jones, S. A., et al.: Fatty acids and Eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4318-4323, 1997

69 Forman, B. M., Chen, J., and Evans, R. M.: Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and γ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4312-4317, 1997

70 Schoonjans, K., Staels, B., and Auwerx, J.: Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.* 37: 907-925, 1996

71 Glaser, K. B.: Regulation of Phospholipase A_2 enzymes: Selective inhibitors and their pharmacological potential. *Adv. Pharmacol.* 32: 31-66, 1995

72 Serhan, C. N., Haeggström, J. Z., and Leslie, C. C.: Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J.* 10: 1147-1158, 1996

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 11.4.1969 in Wiedenest als Sohn von Daniel Herm und seiner Ehefrau Marlis Herm, geb. Hüsken.

seit 1994 verheiratet mit Karin Herm, geb. Wenk, Redakteurin

1998 Geburt von Maximilian Herm

2002 Geburt von Paul Herm

Schulausbildung

1975-79 Gemeinschaftsgrundschule Bergneustadt

1979-88 Wüllenweber-Gymnasium Bergneustadt, Abitur Juni 1988

Zivildienst

1988 bis 1990 im Evangelischen Krankenhaus Bad Godesberg

Hochschulausbildung

1990 bis 1997 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

1992 Ärztliche Vorprüfung

1993 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1995 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1997 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1995 bis 1996 experimenteller Teil der Dissertation bei Prof. Dr. W. Seeger und Prof. Dr. Dr. F. Grimminger in der Klinischen Forschergruppe “Respiratorische Insuffizienz” am Zentrum für Innere Medizin der JLU Gießen

Berufliche Weiterbildung

07/1997 bis 09/1999 Arzt im Praktikum und Assistenzarzt im Hochwaldkrankenhaus Bad Nauheim, Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin

01/1999 Approbation als Arzt

seit 10/1999 Assistenzarzt im Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt, Institut für Anästhesie und operative Intensivmedizin

8. Danksagung

Bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Seeger und Herrn Prof. Dr. Dr. F. Grimminger dafür, daß sie diese Dissertation ermöglicht und in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Ganz herzlich danke ich Herrn Dr. K. Mayer für seine engagierte und ausdauernde Betreuung, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dipl. Biol. S. Gokorsch und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Grimminger für ihre wichtige und tatkräftige Hilfe während der Arbeit im Labor bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Frau Karin für ihre Geduld und Unterstützung.